

HELSINGIN YLIOPISTO  
BIOTIETEIDEN LAITOS  
PERINNÖLLISYYSTIEDE

# Kohdennettu uuden sukupolven DNA-sekvensointi aksonirappeumataudeissa:

---

uudet KIF1A- ja HSPB1-mutaatiot ja fenotyypit

Nella Junna

2015

# Sisällysluettelo

|   |           |
|---|-----------|
| <i>Lyhenteet</i> .....  | <i>v</i>  |
| <b>1. Johdanto</b> .....  | <b>1</b>  |
| <b>2. Kirjallisuuskatsaus</b> .....                                 | <b>2</b>  |
| <b>2.1 Hermosto ja neurologiset sairaudet</b> .....                 | <b>2</b>  |
| <b>2.2 Charcot-Marie-Toothin tauti 2 (CMT2)</b> .....               | <b>3</b>  |
| 2.2.1 Oireet, hoidot ja ennuste .....                               | 3         |
| 2.2.2 Sairauden aiheuttava mekanismi .....                          | 4         |
| 2.2.3 CMT2:n jaottelu ja diagnosointi .....                         | 4         |
| <b>2.3 CMT2:n genetiikka</b> .....                                  | <b>7</b>  |
| 2.3.1 Molekyyli-moottorit ja aksonaalinen kuljetus .....            | 7         |
| 2.3.2 Mitokondriodynamiikka .....                                   | 8         |
| 2.3.3 Sytoskeletonin toiminta .....                                 | 10        |
| 2.3.4 Muita funktioita .....  | 11        |
| <b>2.4 Perinnällinen spastinen paraplegia (HSP)</b> .....           | <b>14</b> |
| 2.4.1 Oireet, hoidot ja ennuste .....                               | 14        |
| 2.4.2 Sairauden aiheuttava mekanismi .....                          | 15        |
| 2.4.3 HSP:n jaottelu ja diagnostiikka .....                         | 15        |
| <b>2.5 HSP:n genetiikka</b> .....                                   | <b>16</b> |
| 2.5.1 Mitokondriodynamiikka .....                                   | 18        |
| 2.5.2 Aksonaalisen kuljetuksen häiriöt .....                        | 18        |
| 2.5.3 ER-verkoston toiminta.....                                    | 19        |
| 2.5.4 BMP-signaali.....   | 21        |
| 2.5.5 Endosomien Membraaniliikenne .....                            | 23        |
| 2.5.6 Primaarinen myeliinihäiriö .....                              | 23        |
| 2.5.7 Kortikospinaaliradan kehityshäiriöt.....                      | 24        |
| 2.5.8 Lipidien synteesi ja metabolia .....                          | 24        |
| <b>2.6 Kohdennettu uuden sukupolven sekvensointimenetelmä</b> ..... | <b>25</b> |
| 2.6.1 Uuden sukupolven sekvensointimenetelmät.....                  | 25        |
| 2.6.2 Kohdennettu uuden sukupolven sekvensointimenetelmä.....       | 26        |

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| 2.6.3      | Sekvensointitulosten analysoiminen.....                            | 27        |
| 2.6.4      | Kohdennetun NGS:n haasteet ja virhelähteet .....                   | 28        |
| 2.6.5      | Kohdennettu NGS diagnostiikan apuvälineenä .....                   | 28        |
| <b>3.</b>  | <b><i>Tavoitteet</i> .....</b>                                     | <b>30</b> |
| <b>4.</b>  | <b><i>Materiaalit ja menetelmät</i>.....</b>                       | <b>31</b> |
| <b>4.1</b> | <b>Potilaat.....</b>   | <b>31</b> |
| 4.1.1      | CMT-potilaat .....   | 31        |
| 4.1.2      | HSP-potilaat.....  | 33        |
| <b>4.2</b> | <b>Kohdennettu uuden sukupolven sekvensointimenetelmä.....</b>     | <b>34</b> |
| 4.2.1      | Sekvensointi.....  | 34        |
| 4.2.2      | Geenipaneeli .....   | 35        |
| 4.2.3      | Ohjelmat ja tietokannat .....                                      | 36        |
| 4.2.4      | Varianttien analysointi.....                                       | 37        |
| 4.2.5      | Pistemutaatiot .....   | 38        |
| 4.2.6      | Pienet insertiot ja deleetiot.....                                 | 39        |
| <b>4.3</b> | <b>Varianttien Sanger-sekvensointi.....</b>                        | <b>39</b> |
| 4.3.1      | PCR-alukkeiden suunnittelu .....                                   | 39        |
| 4.3.2      | PCR-ohjelmat .....   | 40        |
| 4.3.3      | Sekvensointi.....  | 43        |
| <b>4.4</b> | <b>Proteiinieristys fibroblasteista ja HSPB1 Western blot.....</b> | <b>44</b> |
| 4.4.1      | Fibroblastien kasvatus ja proteiinien eristys .....                | 44        |
| 4.4.2      | Western blot.....  | 44        |
| <b>5.</b>  | <b><i>Tulokset</i> .....</b>                                       | <b>46</b> |
| <b>5.1</b> | <b>Kohdennetun sekvensoinnin onnistuminen .....</b>                | <b>46</b> |
| <b>5.2</b> | <b>Varianttien analysoinnin tulokset.....</b>                      | <b>48</b> |
| 5.2.1      | Varianttien analysointi.....                                       | 48        |
| 5.2.2      | Lopputulokset .....  | 51        |
| 5.2.3      | CMT-potilaiden lopputulokset.....                                  | 53        |
| 5.2.4      | HSP-potilaiden lopputulokset.....                                  | 55        |
| <b>5.3</b> | <b>Western blot.....</b>   | <b>56</b> |

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| <b>6.</b>  | <b><i>Tulosten tarkastelu</i></b>   | <b>57</b> |
| <b>6.1</b> | <b>Kohdennetun uuden sukupolven sekvensointimenetelmän onnistuminen</b>   | <b>57</b> |
| 6.1.1      | Sekvensointi  | 57        |
| 6.1.2      | Varianttien analysointi   | 57        |
| <b>6.2</b> | <b>HSP- ja CMT-potilaiden molekulaarisen diagnoosin selvittäminen</b>   | <b>59</b> |
| 6.2.1      | Mutaatioiden patogeneisuuden arviointi  | 59        |
| 6.2.1.1    | Varmasti ja todennäköisesti patogeeniset mutaatiot  | 60        |
| 6.2.1.2    | Mahdolliset tautimutaatiot  | 63        |
| 6.2.1.3    | Potilaat, joille ei löytynyt sairauden aiheuttanutta mutaatiota   | 64        |
| 6.2.2      | Patogeenisten mutaatioiden tunnistamisen ongelmat   | 66        |
| 6.2.3      | Kohdennetun NGS:n soveltuvuus diagnostiikassa   | 66        |
| <b>6.3</b> | <b>Jatkotutkimukset</b>   | <b>68</b> |
| 6.3.1      | <i>KIF1A</i> -geenin <i>de novo</i> missense-mutaatiot moottoridomeenissa aiheuttavat vakavan taudinkuvan   | 68        |
| 6.3.2      | Lyhentynyt <i>HSPB1</i> heikentää solun vastetta väärin laskostuneita proteiineja kohtaan   | 69        |
| <b>7.</b>  | <b><i>Kiitokset</i></b>   | <b>71</b> |
| <b>8.</b>  | <b><i>Lähteet</i></b>   | <b>72</b> |
|            | <b><i>Liitteet</i></b>  |           |
|            | <b><i>Liite A: De novo mutations in the motor domain of KIF1A cause cognitive impairment, spastic paraparesis axonal neuropathy, and cerebellar atrophy</i></b> |           |
|            | <b><i>Liite B: Truncated HSPB1 causes axonal neuropathy and impairs tolerance to unfolded protein stress</i></b>  |           |

## Lyhenteet

|       |  |
|-------|--|
| AD    | Autosomaalisesti dominoiva   |
| ALS   | Amyotrofinen lateraaliskleroosi (liikehermosairaus)                  |
| AR    | Autosomaalisesti resessiivinen                                       |
| ARSs  | Aminoasyyli-tRNA-syntetaasit   |
| BMP   | Bone morphogenetic proteins  |
| BSA   | Bovine serum albumin   |
| CMT   | Charcot-Marie-Toothin tauti  |
| CNV   | Copy number variation, kopiolukuvaihtelu                             |
| dHMN  | Distaalinen hereditaarinen motorinen neuropatia (liikehermosairaus)  |
| dSMA  | Distaalinen spinaalinen lihasatrofia (neuromuskulaarisairaus)        |
| ER    | Endoplasmic reticulum, endoplasmakalvosto                            |
| EVS   | Exome Variant Server, eksomitietokanta                               |
| HMSN  | Hereditaarinen motosensorinen neuropatia eli CMT                     |
| HSAN  | Hereditaarinen sensorinen ja autonominen neuropatia                  |
| HSN   | Hereditaarinen sensorinen neuropatia                                 |
| HSP   | Hereditaarinen spastinen paraplegia                                  |
| sHSP  | Small heat shock protein   |
| IGV   | Integrative Genome Viewer  |
| Indel | Pienet insertiot ja deleetiot  |
| NCV   | Hermojohtonopeus (nerve conduction velocity)                         |
| NGS   | Uuden sukupolven sekvensointimenetelmät (Next-generation sequencing) |

|          |  |
|----------|--|
| OMIM     | Online Mendelian Inheritance in Man, tietokanta ihmisen geneettisistä sairauksista |
| PBS      | Phosphate-buffered saline  |
| PLS      | Primaarinen lateraaliskleroosi   |
| SDS-PAGE | Natriumdodekyylisulfaattipolyakryyliamidigeelielektroforeesi                       |
| SISu     | Sequencing Initiative Suomi, eksomitietokanta                                      |
| SNP      | Yhden nukleotidin polymorfismi (Single nucleotide polymorphism)                    |
| SPG      | Spastic gait gene, lyhenne HSP:hen liittyville geenilokuksille                     |
| TBST     | TBS (Tris-Buffered Saline) + Tween 20 - puskuriliuos                               |
| WES      | Koko eksomin sekvensointi (Whole exome sequencing)                                 |
| WGS      | Koko genomin sekvensointi (Whole genome sequencing)                                |

# 1. Johdanto

Charcot-Marie-Toothin tauti (CMT) ja perinnöllinen spastinen paraplegia (HSP) ovat kliinisesti ja geneettisesti hyvin heterogeenisiä sairauksia. Kumpaakin sairautta aiheuttavat mutaatiot kymmenissä eri geeneissä ja usein kunkin geenin kohdalla tunnetaan lukuisia eri tautia aiheuttavia mutaatioita eri osista geeniä. Näiden sairauksien diagnosointi geneettisellä tasolla jääkin usein puutteelliseksi. Tyypillisesti on saatettu sekvensoida yksi tai kaksi geeniä, mutta näin on vain harvalle potilaalle löytynyt geneettinen diagnoosi (Hoyer et al. 2014). Sekvensointimenetelmät ovat viime vuosina kehittyneet huomattavasti ja ne ovat tulleet nopeammiksi ja halvemmiksi. Kohdennetulla uuden sukupolven sekvensointimenetelmällä on mahdollista sekvensoida kaikki sairauden kannalta oleelliset geenit, jolloin mahdollisuudet löytää tautia aiheuttava mutaatio paranevat.

CMT:tä ja HSP:tä aiheuttavien geenien ja mutaatioiden löytämisellä ja niitä tutkimalla opitaan yhä paremmin tuntemaan näitä sairauksia aiheuttavat mekanismit. Sairausmekanismien ymmärtäminen mahdollistaa myös hoitojen ja jopa parannuskeinojen kehittämisen. Potilaalle sairauden aiheuttaneen mutaation tunnistaminen kertoo taudin ennusteen ja voi vaikuttaa esimerkiksi perhesuunnitteluun. Lisäksi, vaikka nämä sairaudet ovat suhteellisen harvinaisia, niiden taustalla on samanlaisia sairausmekanismeja kuin monessa muussa neurodegeneratiivisessa sairaudessa, joten CMT:n ja HSP:n tutkimisesta voi olla laajempaakin hyötyä.

CMT:llä ja HSP:llä on eroavaisuuksia, mutta myös samankaltaisuuksia. CMT:ssä vaurio on ääreishermoston liike- ja tuntohermoissa, HSP:ssä taas keskushermoston aksoneissa kortikospinaaliradassa. Yhteistä näillä sairauksilla on se, että vauriot kohdistuvat erityisesti pitkiin aksoneihin ja vaikutukset ovat liike- ja tuntohermoradoissa. Kummatkin sairaudet alkavat yleensä hiukan myöhemmällä iällä ja oireet ovat yleensä eteneviä. Geneettiseltä taustaltaan CMT:ssä ja HSP:ssä on jonkin verran yhteisiä tekijöitä ja lisäksi kummankin sairauden geeneissä on yhteistä funktionaalisella tasolla. Myelinaatioon liittyy osa CMT-geeneistä, kuten *GJB1* ja HSP-geeneistä esimerkiksi *PLP1*. Osa liittyy membraaniliikenteeseen, kuten CMT:hen liittyvä *RAB7* ja HSP:hen liittyvät *SPAST*, *ATL1* ja *REEP1*. Monet geenit liittyvät sytoskeletonin stabiilisuuteen tai ovat moottoriproteiineja, kuten CMT:hen liittyvä *LMNA* ja HSP:hen liittyvä *KIF5A*. Monet geenit liittyvät myös mitokondriodynamiikkaan, kuten *MFN2* ja *GDAP1* CMT:ssä ja *SPG7* ja *HSPD1* HSP:ssä. Toisaalta mutaatiot *BSCL2*-geenissä aiheuttavat Silver-syndroomaa, jonka oireista osa sopii CMT:hen ja osa HSP:hen. Mutaatiot HSP:hen liittyvissä geeneissä *KIF5A*, *NIPA1* ja *SPAST* voivat HSP:n lisäksi aiheuttaa lisäoireena ääreishermostollista neuropatiaa (Timmerman, Clowes & Reid 2013).

## 2. Kirjallisuuskatsaus

### 2.1 Hermosto ja neurologiset sairaudet

Hermostoon kuuluvat hermosolut eli neuronit, hermotukisolut eli gliasolut ja sidekudos, johon kuuluvat aivokalvot, verisuonet ja sidekudos ääreishermostossa. Neuronien solukeskuksesta eli soomasta lähtevät aksonit, jotka vievät hermoimpulssin eteenpäin kohdesoluun ja dendriitit, jotka vastaanottavat hermoimpulssin ja vievät sen solukeskukseen. Aksoneita on tyypillisesti vain yksi hermosolua kohden ja dendriittejä runsaasti. Aksonit kuitenkin yleensä haaroittuvat loppupäästään voimakkaasti. Aksonien ja dendriittien rungon tukiranka muodostuu neurofilamenttiproteiineista. Hermoimpulssi on neuronin kalvoa pitkin etenevä depolarisaatio eli aktiopotentiaali. Ääreishermosto muodostuu selkäydinhermoista, selkäytimen takajuuren ganglioista (ganglio on neuronien muodostama tiivis ryhmä), autonomisista ganglioista ja hermopunoksista. Hermo on kimppu aksoneita, joita peittää sidekudoksinen tuppi. Ääreishermostossa aksonin ympärille muodostuu myeliinituppi, jonka muodostavat Schwannin solut, jotka kuuluvat hermotukisoluihin. Erityisesti liikehermosäikeet ja eräät tuntohermosäikeet ovat hyvin vahvasti myelinoituja. Selkäytimen etusarven alfamotoneuronit hermottavat useita lihassoluja. Alfamotoneuronien pääte muodostaa lihaksen pinnalle hermo-lihasliitoksen, jonka kautta aksonin depolarisaatio leviää lihassoluun ja saa aikaan lihassupistuksen. Hermotus tulee liikeaivokuorelta. Alfamotoneuronin vaurio voi aiheuttaa spastisuuden eli lihastonuksen lisäyksen (Soinila, Kaste & Somer 2006).

Proteiinien synteesi tapahtuu neuronin solukeskuksessa, josta tuotetut proteiinit sekä mitokondriot ja muut solun organellit kuljetetaan neuronin muihin osiin, esimerkiksi synaptiset proteiinit aksonin terminaaliin. Kinesiinit kuljettavat rahdin solukeskuksesta synapseihin mikrotubuluksia pitkin, dyneiini kuljettaa solukeskukseen päin. Aksonaalisen kuljetuksen matka voi olla jopa 1 m (De Vos et al. 2008).

Perinnölliset neurologiset sairaudet ovat yleensä harvinaisia, mutta niitä tunnetaan tuhansia, joten yhdessä ne ovat merkittävä sairausryhmä. Oireet vaihtelevat usein paljon samassakin sairaudessa johtuen aivojen rakenteesta ja plastisiteetista. Siksi diagnoosin muodostaminen on usein haastavaa. Hermokudoksessa ekspressoituvien geenien määrä on suurempi kuin muissa kudoksissa ja toisaalta hermoston solujen uusiutumiskyky on vähäisempi, sillä kudოსvaurioiden korjausmenetelmät ovat heikompia kuin muissa kudoksissa (Soinila, Kaste & Somer 2006).



## 2.2 Charcot-Marie-Toothin tauti 2 (CMT2)

Charcot-Marie-Toothin tauti (CMT), eli hereditaarinen motosensorinen neuropatia (HMSN) on kliinisesti ja geneettisesti heterogeeninen ryhmä neurologisia sairauksia. CMT on yleisin periytyvä neurologinen sairaus, sillä sen prevalenssi on 1:2500.

CMT voidaan jakaa kahteen alatyyppiin, CMT1 ja CMT2. CMT1 on demyelinoiva tyyppi, jossa myeliinituppi vaurioituu. CMT2 on aksonaalinen tyyppi, jossa on aksonin toimintahäiriö. Alatyypit voidaan erottaa toisistaan hermojohtonopeuden (nerve conduction velocity, NCV) avulla, jossa mitataan eri liike- ja tuntohermojen sähköistä toimintaa. CMT1:ssä NCV on alle 38 m/s, CMT2:ssa yli 38 m/s. Usein erotetaan erilliseksi ryhmäkseen myös välimuotoinen CMT, jossa NCV on 30–45 m/s. CMT1 ja CMT2 eivät eroa toisistaan oireiden puolesta lainkaan. Näiden lisäksi luokitellaan erilleen CMT3 eli Dejerine-Sottas-tauti, joka on demyelinoivaa tyyppiä. CMT3 on muita kahta muotoa vakavampi sairaus ja alkaa jo lapsuudessa. Lisäksi CMT4 erotetaan usein omaksi alatyypiksi, se on resessiivisesti periytyvä CMT (Reilly, Murphy & Laura 2011, Szigeti, Lupski 2009).

CMT voi periä dominantisti tai resessiivisesti sekä autosomaalisesti tai X-kromosomaalisesti. CMT1 on kahdesta muodosta yleisempi ja 70 % tapauksista aiheutuu mutaatioista *PMP22*-geenissä. CMT2:ssa dominantteja muotoja on enemmän kuin resessiivisiä. Kaikkiaan CMT:hen liittyviä geenejä tunnetaan yli 40 ja CMT2:een liittyviä geenejä noin 20. CMT2-geenien funktiot liittyvät esimerkiksi aksonaaliseen kuljetukseen, sytoskeletonin toimintaan,  $\text{Ca}^{2+}$ -homeostaasin säätelyyn ja mitokondrioihin. CMT2:een liitetyistä geeneistä yksikään ei aiheuta suurta osaa sairaustapauksista kuten CMT1:n tapauksessa. Yleisin syy CMT2:n taustalla on mutaatio *MFN2*-geenissä, mutta niidenkin osuus on vain noin 20 %. Luultavasti monet CMT2:ta aiheuttavat mutaatiot ovat spesifisiä tietyille perheille. Lisäksi kaikkia CMT2:een liittyviä geenejä ei vielä tunneta (Reilly, Murphy & Laura 2011, Baets, De Jonghe & Timmerman 2014).

### 2.2.1 Oireet, hoidot ja ennuste

CMT2:ssa vaikeusaste ja oireet vaihtelevat huomattavasti. CMT2:n tyypillisiä oireita ovat raajojen etenevä lihasheikkous ja lihaskato, tunnon katoaminen käsistä ja jaloista, sekä jalkaviat kuten *pescavus* (kaarijalka) ja vasaravarpaat. Oireet alkavat yleensä alaraajoista ja yläraajoihin voi tulla vastaavia oireita taudin edetessä. Potilailla voi olla tunto-oireita, kuten alentunut kivun ja lämpötilan tuntemus sekä värinätunnon heikkeneminen ja heikentynyt jänteiden asennon tunteminen. Oireet painottuvat raajojen ääreisosiin. Edellä mainittujen oireiden lisäksi voi olla myös muita oireita, ku-

ten skolioosi, äänihuulihalvaus ja glaukooma (silmänpainetauti). Klassisessa CMT2-fenotyypissä on sekä liike- että tunto-oireita. Sairauden eri muodoissa oireet voivat myös painottua joko liike- tai tunto-oireisiin. X-kromosomaalisesti periytyvässä CMT2:ssa miehillä on usein vakavammat oireet kuin naisilla ja NCV on 30–45 m/s (Gentil, Cooper 2012, Reilly, Shy 2009, Zuchner, Vance 2006).

CMT2:n oireet alkavat yleisimmin 20 ikävuoteen mennessä. Alkamisikä tosin vaihtelee huomattavasti ja voi olla korkeakin. Ensimmäisenä oireena on lihasheikkoutta alaraajojen alemmissa osissa, joka etenee ajan myötä raajoissa ylöspäin. Potilaalle voi kehittyä jalkavikoja sekä lihasheikkoutta yläraajoihin. Lihasten venytysrefleksit katoavat nilkoista ja myöhemmin voi kehittyä tunto-oireita. CMT2 ei vaikuta eliniän ennusteeseen. Parannuskeinoa ei ole, mutta hoitona on tukihoitoja, kuten fysioterapia ja oireiden mukainen lääkehoito (Szigeti, Lupski 2009).

### **2.2.2 Sairauden aiheuttava mekanismi**

CMT2:n oireiden syynä on aksonivaurio, mutta aksonien myelinaatio säilyy normaalina. CMT2:ssa NCV on siis normaali, mutta hermoimpulssien määrä laskee, eli toiminnallisten aksonien määrä pienenee, mikä johtaa CMT2:n tyypillisiin oireisiin. (Zuchner, Vance 2006) Aksonivaurio tapahtuu ääreishermoston liike- ja tuntohermoissa. Sairausmekanismit liittyvät erityisen pitkiin aksoneihin, joissa on pitkä matka solun keskuksesta sen ääriosiin. Neuronit ovat hyvin polarisoituja ja aksonien suuri pituus vaatii monimutkaisia koneistoja proteiinien, mitokondrioiden ja muiden solun organellien kuljetukseen ja energiaa näihin toimintoihin. Pitkissä aksoneissa tietyt vauriot tulevat esiin, jotka eivät muualla elimistössä näy (Gentil, Cooper 2012).

### **2.2.3 CMT2:n jaottelu ja diagnosointi**

Ensimmäisenä oireena potilaalla on usein ääreishermostollinen neuropatia. Erotusdiagnostiikassa tutkitaan, onko mukana muiden elinten oireita tai muita keskushermoston oireita, jotka viittaavat muihin sairauksiin. CMT2:n diagnosoinnissa ensimmäisenä täytyy tunnistaa, onko neuropatia genettinen. Sukuhistorian lisäksi tähän viittaavat oireiden alkaminen lapsuudessa, sairauden pitkä ja hidas eteneminen sekä jalkaviat (Reilly, Shy 2009). CMT2:ssa on samoja oireita hereditäärisen sensorisen ja autonomisen neuropatian (HSAN) ja distaalisen hereditäärisen motorisen neuropatian (dHMN) kanssa. Nämä sairaudet voivat aiheuttaa samoja oireita, vaikka eri geenit olisivat taustalla, tai toisaalta erilaisia oireita, vaikka saman geenin mutaatio olisi aiheuttajana. CMT2 voi myös se-

koittua distaaliseen spinaaliseen lihasatrofiaan (dSMA) ja spastiseen paraplegiaan (Reilly, Murphy & Laura 2011, Zuchner, Vance 2006). Toisaalta eräät muut oireet voivat viitata tiettyihin CMT-geeneihin. Esimerkiksi *NEFL*-mutaatioissa potilailla on usein myös hyperkeratoosia (ihon sarveiskerroksen paksuuntuminen) ja glaukoomaa. CMT2-potilailla on usein myös lihasheikkoudesta johtuvaa skolioosia (20 % potilaista). CMT2:n diagnosoinnissa käytetään apuna esimerkiksi EMG:tä (elektromyografia eli lihassähkökäyrä) ja NCV-tutkimuksia (Szigeti, Lupski 2009).

CMT voidaan luokitella neurologisten tutkimusten, sairauden aiheuttaneen geenin ja periytymismallin mukaan. Luokittelussa tärkein on hermojohtonopeus. CMT2 voidaan jaotella tarkemmin sairauden aiheuttaneen tautigeenin mukaan, vaikka sama geeni voi aiheuttaa myös eri alatyypin. Taulukossa 1 on tunnetut CMT2:een liittyvät geenit sekä niiden lokukset. Alatyypit on nimetty geenien mukaan CMT2A, CMT2B jne. (Reilly, Murphy & Laura 2011, Reilly, Shy 2009).

CMT2 voidaan jakaa oireiden perusteella kolmeen fenotyyppiin: klassiseen, sensoriseen ja motoriiseen tyyppiin. Klassisessa CMT2-fenotyypissä on liike- ja tunto-oireita, NCV on normaali, oireet alkavat varhaisaikuisuudessa ja potilaalla on aksonaalista neuropatiaa. Klassista fenotyyppiä aiheuttavat muun muassa mutaatiot geeneissä *MFN2*, *MPZ*, *NEFL*, *AARS* ja *GDAP1*. Sensorisessa fenotyypissä tunto-oireita on enemmän ja liikeoireet tulevat myöhemmin ja usein lievempinä kuin klassisessa tyyppissä. Tätä fenotyyppiä aiheuttavat mutaatiot muun muassa geeneissä *SPTLC1* ja *RAB7*. Motorisessa fenotyypissä vastaavasti liikeoireet ovat hallitsevina. Tähän fenotyyppiin on liitetty geenit *GARS*, *HSPB1*, *HSPB8*, *TRPV4* ja *BSCL2* (Reilly, Murphy & Laura 2011).

CMT2 geneettisen tason diagnosointi on perinteisesti ollut korkeintaan yleisimpien CMT2-geenien, kuten *MFN2*, sekvensoimista. Oireiden tai sukupuun kautta on ehkä osattu epäillä jotain tiettyä geeniä, joka on sekvensoitu. Mutta näin heterogeenisellä sairaudella muutaman geenin sekvensoinnilla vain harva potilas on saanut geneettisen diagnoosin (Hoyer et al. 2014).

**Taulukko 1: CMT2:n alatyypit lokuksen mukaan**

| <b>Alatyypit</b> | <b>Geeni</b>   |   | <b>Lokus</b> |
|------------------|----------------|---|--------------|
| <b>CMT2A1</b>    | <i>KIF1B</i>   | Kinesin family member 1B  | 1p36.22      |
| <b>CMT2A2</b>    | <i>MFN2</i>    | Mitofusin 2   | 1p36.22      |
| <b>CMT2B</b>     | <i>RAB7A</i>   | Ras-associated protein Rab7   | 3q21.3       |
| <b>CMT2B1</b>    | <i>LMNA</i>    | Lamin a/c   | 1q22         |
| <b>CMT2B2</b>    | <i>MED25</i>   | Mediator complex subunit 25   | 19q13.33     |
| <b>CMT2C</b>     | <i>TRPV4</i>   | Transient receptor potential cation channel, sub-family V, member 4 | 12q24.11     |
| <b>CMT2D</b>     | <i>GARS</i>    | Glycyl-tRNA synthetase  | 7p14.3       |
| <b>CMT2E</b>     | <i>NEFL</i>    | Neurofilament protein, light polypeptide                            | 8p21.2       |
| <b>CMT2F</b>     | <i>HSPB1</i>   | Heat-shock 27-kD protein 1 (HSP27)                                  | 7q11.23      |
| <b>CMT2G</b>     | ?              |   | 12q12-q13.3  |
| <b>CMT2H</b>     | <i>GDAP1</i>   | Ganglioside-induced differentiation-associated protein 1            | 8q21.11      |
| <b>CMT2K</b>     | <i>GDAP1</i>   |   | 8q21.11      |
| <b>CMT2L</b>     | <i>HSPB8</i>   | Heat-shock 22-kD protein 8 (HSP22)                                  | 12q24.23     |
| <b>CMT2M</b>     | <i>DNM2</i>    | Dynamin 2   | 19p13.2      |
| <b>CMT2N</b>     | <i>AARS</i>    | Alanyl-tRNA synthetase  | 16q22.1      |
| <b>CMT2O</b>     | <i>DYNC1H1</i> | Dynein, cytoplasmic 1, heavy chain 1                                | 14q32.31     |
| <b>CMT2P</b>     | <i>LRSAM1</i>  | Leucine-rich repeat- and sterile alpha motif-containing 1           | 9q33.3       |
| <b>CMT2Q</b>     | <i>DHTKD1</i>  | Dehydrogenase E1 and transketolase domains-containing protein 1     | 10p14        |
| <b>CMT2R</b>     | <i>TRIM2</i>   | Tripartite motif-containing protein 2                               | 4q31.1       |

## 2.3 CMT2:n genetiikka

CMT2:tä aiheuttavia geenejä tunnetaan parikymmentä, tosin suurta osaa niistä ei ole vielä tunnistettu. Monia CMT2:een liittyviä geenejä ekspressoidaan kaikkialla elimistössä. Mutaatioiden vaikutukset eivät kuitenkaan usein näy kaikissa soluissa, vaan juuri pitkissä hermosoluissa. Nämä geenit ovat usein molekyylimoottoreita tai liittyvät vesikkelikuljetukseen, mitokondrioiden toimintaan tai sytoskeletoniin. Ne voivat myös vaikuttaa neurofilamenttien kautta tai liittyä kalsiumin homeostaasiin säätelyyn. CMT2:een liittyvät geenit ovat mendelistisiä ja penetranssi on yleensä täydellinen, joskin sairaus voi alkaa vasta vanhemmalla iällä ja oireet sekä sairauden vakavuus vaihtelevat huomattavasti (Gentil, Cooper 2012, Reilly, Murphy & Laura 2011, Zuchner, Vance 2006). Seuraavissa kappaleissa esittelen yleisimpiä CMT2-geenejä funktionaalisiin ryhmiin jaoteltuna.

### 2.3.1 Molekyylimoottorit ja aksonaalinen kuljetus

Osa CMT2:een liittyvistä geeneistä koodaa molekyylimoottoreita, kuten *DYNC1H1* tai ne liittyvät muuten aksonaaliseen kuljetukseen. Ne voivat liittyä myös vesikkelikuljetukseen, kuten *RAB7*. Aksoneissa mikrotubuluksen plus-pää kulkee synapsiin ja miinus-pää solukeskukseen. Kinesiinit kuljettavat plus-pään suuntaan ja dyneiini miinus-päähän, eli solukeskukseen (De Vos et al. 2008).

*DYNC1H1* (*Cytoplasmic dynein heavy chain 1*) on suuri geeni, sillä sen koko on 14 kb ja eksoneita on 78. Proteiinin koko on 4646 aa. *DYNC1H1*-mutaatiot aiheuttavat dominoivasti periytyvää CMT2:ta. *DYNC1H1*-potilailla motorisen kehityksen virstanpylväät ovat viivästyneet, alaraajojen etenevä lihasheikkous ja – kato alkavat aikaisin sekä jaloissa on tyypillisesti *pes cavus*. Yläraajoireita ei ole. NCV on normaali ja aksoneissa on vaurioitumista. Monilla potilailla on lisäksi alaraajojen neuropatiakipuja. Sytoplasmisen dyneiini on suuri moottoriproteiinikompleksi. Se on ensisijainen moottoriproteiini hermosolun ääreisosista solukeskukseen suuntautuvassa aksonaalisessa kuljetuksessa. 532 kDa:n *DYNC1H1* homodimeeri muodostaa dyneiinin ytimen ja on vastuussa proteiinikompleksin sitoutumisesta ja liikkeestä mikrotubuluksia pitkin. Muut dyneiinin alayksiköt vuorovaikuttavat rahdin kanssa ja vaikuttavat kompleksin stabiilisuuteen. Hiirimallien perusteella *DYNC1H1*-mutaatioilla voisi olla dominantti negatiivinen vaikutus (eli mutatoitunut estää tai heikentää normaalin proteiinin toimintaa), vaikkakin mutaatioiden tautia aiheuttava mekanismi on toistaiseksi epäselvä. Moottoriproteiinit ja aksonaalinen kuljetus ovat kuitenkin äärimmäisen tärkeitä hermosolujen normaalille toiminnalle (Weedon et al. 2011).

*RAB7A (RAS-associated protein RAB7)* -mutaatiot aiheuttavat CMT2:ta, joka periytyy dominoivasti. Potilailla on tyypillisten CMT2-oireiden lisäksi usein paljon haavaumia jaloissa sekä toistuvia infektioita, jotka johtavat usein varpaiden amputaatioon. Tunto-oireita saattaa myös olla, mutta sairauden vaikeusaste vaihtelee paljon. Tunnetut *RAB7*-mutaatiot ovat olleet aminohappoa muuttavia pistemutaatioita (missense). *RAB7* ekspressoituu kaikkialla, myös hermoissa, mutta kaikkein eniten ihmisellä luustolihaksissa. *RAB7* on GTPaasi ja se on mukana myöhäisten endosomien ja lysosomien välisessä kuljetuksessa, joka liittyy proteiinien hajottamiseen. *RAB7* kuuluu proteiiniperheeseen *Rab family of Ras-related GTPases*, jotka ovat tärkeitä solun sisäisen membraanikuljetuksen säätelyssä ja ne säätelevät vesikulaarista kuljetusta efektori- ja moottoriproteiinien välityksellä. *RAB7*:n efektoriproteiini *RILP (Rab interacting lysosomal protein)* aiheuttaa osaltaan dyneiini-dynaktiini-moottoriproteiinikompleksien tuomista kuljetuspaikalle ja säätelee kuljetusta kohti mikrotubulusten miinuspäätä. Dominantti negatiivisesti vaikuttavat *RAB7*-mutaatiot vaikuttaisivat estävän lysosomaalista hajotusta hajottamalla lysosomit. Tarkempaa mekanismia, millä *RAB7*-mutaatiot aiheuttavat CMT2:n, ei kuitenkaan vielä tunneta (Verhoeven et al. 2003a).

### 2.3.2 Mitokondriodynamiikka

Mitokondrioiden fuusio ja fissio muokkaavat mitokondrioiden morfologiaa ja kokoa sekä säätelevät mitokondrioiden jakautumista ja toimintaa. Mitokondriodynamiikan muutokset voivat johtaa niiden alentuneeseen määrään aksoneissa. Hermosolut tarvitsevat paljon energiaa, erityisesti sähköisten impulssien ja ionisen transmission vuoksi. Lisäksi aksoneissa mitokondrioiden oikea sijainti vaikuttaa olevan tärkeää muiden tehtävien, kuten kalsiumin säätelyn takia. Mitokondrioita kuljetetaan solukeskuksesta aksoniin ja takaisin hajotettavaksi. Mitokondrioiden liike aksoneita pitkin energiaa tarvitseville paikoille on tärkeää hermojen normaalin toiminnan takia. Kuljetuksesta vastaavat kinesiinit ja dyneiini. Mitokondrioiden toiminta liittyy siis myös aksonaaliseen kuljetukseen ja moottoriproteiineihin (De Vos et al. 2008, Saxton, Hollenbeck 2012).

*GDAP1 (ganglioside-induced differentiation-associated protein 1)* aiheuttaa useaa erityyppistä CMT:tä, sekä resessiivisesti että dominoivasti. *GDAP1*:een liittyvillä CMT1-tapauksilla taudinkuva on hiukan erilainen kuin tyypillisessä CMT1:ssä: *GDAP1*-mutaatiot aiheuttavat vakavan neuropatian, jossa tapahtuu aksonien vaurioitumista sekä vaihtelevassa määrin demyelinaatiota. Mutaatiotyyppejä tunnetaan missense-mutaatioita, ennenaikaisen stop-kodonin aiheuttavia nonsense-mutaatioita, lukuraamia muuttavia frameshift-mutaatioita sekä silmukointimutaatioita ja niitä tunnetaan eri alueilla geeninä. Resessiiviset muodot ovat vakavampia kuin dominoivat ja ne alkavat jo

aikaisin lapsuudessa. Jaloissa ja käsissä on vakavaa lihasheikkoutta ja – katoa. Usein lisä-oireena on äänihuulihalvaus. Proteiinin lyhentävillä mutaatioilla taudinkuva on vakavampi kuin missense-mutaatioilla (Cassereau et al. 2011, Cuesta et al. 2002). Suomessa *GDAP1*-mutaatioiden osuus CMT2-potilailla on 14 % (Ylikallio et al. 2014). *GDAP1* on mahdollisesti mukana neuronaalisen kehityksen signaalitransduktioreiteissa. *GDAP1* ekspressoituu eniten aivoissa ja luuytimessä, mutta myös laajasti muualla. *GDAP1* kuuluu glutationi-S-transferaasien (GSTs) entsyymiperheeseen, joilla on rooli solujen detoksifikaatiossa. *GDAP1* vaikuttaisi olevan mukana mitokondrioiden fissiossa. *GDAP1*:n yliekspressio aiheuttaa mitokondrioverkoston fragmentoitumista, joka sekoittaa mitokondrioiden fuusiota. Resessiivisissä muodoissa proteiini on usein lyhentynyt, ollen hyvin epästabiili, ja johtaen *GDAP1*:n funktionaalisuuden menetykseen (Cuesta et al. 2002, Cassereau et al. 2011).

*MFN2* (*mitofusin 2*)-mutaatiot aiheuttavat dominoivaa CMT2:ta. Se on yleisin geeni CMT2:n taustalla, aiheuttaen 19–33% CMT2-tapauksista (Baloh et al. 2007), tosin Suomessa osuus lienee vain 11 % (Ylikallio et al. 2014). Potilailla on lihasheikkoutta ja -katoa sekä sensorista katoa raajojen ääriosissa. Alkamisikä on yleisimmin 3-17 vuotta, vaikka sairaus saattaa alkaa myöhemminkin. Löydettyt mutaatiot ovat kaikki olleet missense-mutaatioita. Mutaatioista iso osa sijaitsee konservoituneen GTPaasi-domeenin alueella. Tämä domeeni on elintärkeä mitofusiinien toiminnalle. *MFN2* on mitokondrion ulkokalvon transmembraaniproteiini ja säätelee mitokondrioverkoston arkkitehtuuria mitokondrioiden fuusion avulla. Se muodostaa mitokondrion fuusion aikana oligomeerikomplekseja *MFN1*:n kanssa ja ne yhdistävät viereisten mitokondrioiden ulkokalvot. Mitokondrioilla on dynaamisesti säädelty tasapaino fuusio- ja fissioreaktioiden välillä ja putkimainen ja haaroittuva membraaniverkosto. Tämä verkosto on elintärkeä solun toimintojen kannalta: toimiva membraanipotentiaali mitokondrioiden membraaneissa on edellytys energian saamiselle koko soluun. *MFN2* liittyy myös apoptoosin säätelyyn. *MFN2* ekspressoituu kaikkialla (Zuchner et al. 2004). *MFN2* kuuluu proteiiniperheeseen *Dynamin family GTPases*. Muuntuneet *MFN2*-proteiinit voivat aiheuttaa häiriöitä mitokondrioiden aksonaalisessa kuljetuksessa ja toisaalta mitokondrioiden aggregoitumista. Aksonaalinen mitokondrioiden kuljetus käyttää ATP-riippuvaisia moottoriproteiineja, kinesiiniä ja dyneiiniä. *MFN2*-mutaatiot mahdollisesti ehkäisevät mitokondrion kiinnittymistä mikrotubuluksen moottorikompleksiin (Baloh et al. 2007).

### 2.3.3 Sytoskeletonin toiminta

Aksonien rungon muodostaa neurofilamenttien muodostama tukiranka, joten toimiva sytoskeleton on edellytys normaalille aksonaaliselle kuljetukselle. Lämpöshokkiproteiinit (Heat shock protein, Hsp) liittyvät neurofilamenttien kokoamiseen.

*NEFL* (*Neurofilament light polypeptide*) liittyy dominoivasti periytyvään CMT2:een. Potilailla on lihaskatoa ja – heikkoutta, erityisesti alaraajoissa sekä kävelyvaikeuksia ja jaloissa *pes cavus*. Tuntohäiriöitä voi olla myös. Osalla potilaista on myös hyperkeratoosi (ihon sarveiskerroksen paksuuntuminen). *NEFL*:n heteropolymeerit muodostavat neurofilamentin, jotka ovat tyypin IV välimuotoisia filamentteja. Neurofilamentit tuotetaan solukeskuksessa ja kuljetetaan aksoneihin, jossa ne muodostavat filamenttiverkoston. Neurofilamentit ovat yleisin välimuotoinen filamentti hermosoluissa. *NEFL*-mutaatiot saattavat estää neurofilamenttien oikean kasautumisen ja aiheuttaa aggregaatteja, mikä vaikuttaisi aksonaaliseen kuljetukseen. Neurofilamenttiproteiineja ovat myös NEFM (medium) ja NEFH (heavy). *NEFL* on kuitenkin neurofilamenttiproteiineista tärkein, sillä NEFM ja NEFH eivät pysty muodostamaan 10 nm filamenttia ilman *NEFL*:ää. *NEFL* osallistuu myös muiden neurofilamenttien ekspression säätelyyn (Mersiyanova et al. 2000).

*LMNA* (*Lamin a/c*)-mutaatiot aiheuttavat resessiivistä CMT2:ta. Näillä potilailla oireet alkavat usein varhain ja taudinkuva on vakava. Muuten oireet ovat CMT2:lle tyypillisiä. *LMNA* liittyy myös muihin sairauksiin, kuten hartia-lantioengasdystrofiaan ja Emery-Dreifuss lihasdystrofiaan. *LMNA*:ssa on ilmeisesti eriäviä funktionaalisia domeeneja, jotka ovat tärkeitä erilaisille solutyypeille, joten mutaatiot eri domeeneissa voivat johtaa hyvinkin erilaisiin sairauksiin. Proteiini, lamiini a/c, on tumakotelon proteiini. *LMNA* ekspressoituu kaikkialla, mutta sen ekspressiotaso vaihtelee eri neuronaaalisissa solutyypeissä ja eri solun erilaistumisvaiheissa, joten se ehkä vaikuttaa aksonien kehittymiseen. Alkuperäinen *LMNA*-mutaatio sijaitsi Rod-domeenissa, joka on tärkeä proteiini-interaktioissa. Mutaatio luultavasti häiritsee näitä interaktioita ja sitä kautta solun toimintoja (De Sandre-Giovannoli et al. 2002).

Pienistä lämpöshokkiproteiineista (*Small heat shock proteins*, sHSPs) kaksi liittyy CMT2:een. Ne ovat ns. chaperoniproteiineja, jotka suojaavat solua sitoutumalla väärin laskostuneisiin proteiineihin, jotka muuten muodostaisivat solulle vahingollisia aggregaatteja. Tämä tapahtuu ATP-riippumattomasti. Sitoutumisen jälkeen muut, ATP-riippuvaliset proteiinit korjaavat tai hajottavat väärin laskostuneen proteiinin. Mutaatiot sHSP-proteiineissa voivat heikentää niiden interaktioita kohdeproteiinien kanssa. sHSP-proteiineille yhteinen piirre on 90 aa:n kokoinen  $\alpha$ -crystallin-domeeni, joka on hyvin konservoitunut (Basha, O'Neill & Vierling 2012). *HSPB1* (*heat-shock 27*



*kDa protein 1*)-geenissä on vain kolme eksonia ja sen koko on 909 bp. Proteiinin koko on 205 aa. *HSPB1*-mutaatiot aiheuttavat dominoivasti periytyvää CMT2:ta. Potilailla on CMT2:lle tyypillistä etenevää lihasheikkoutta ja – katoa sekä lieviä tuntohäiriöitä. Oireiden alkamisikä on keskimäärin 15–25 vuotta. Alkuperäinen löydetty mutaatio aiheutti ennen aikaisen STOP-kodonin, mutta tunetaan myös paljon *HSPB1*:n missense-mutaatioita. Mutaatiot ovat olleet konservoituneilla alueilla, pääosin  $\alpha$ -crystallin-domeenissa (Evgrafov et al. 2004). HSPB1 on siis ns. chaperoniproteiini, joka suojaa solua erilaisilta stressitekijöiltä, kuten väärin laskostuneilta proteiineilta sitoutumalla niihin. Häiriöt HSPB1:n toiminnassa voisivat johtaa aggregaatteihin, häiriöihin sytoskeletonin rakenteessa ja aksonaalisessa kuljetuksessa sekä eri Hsp-proteiinien välisissä interaktioissa ja toisaalta häiriöihin apoptoosissa. *HSPB1* ekspressoituu kaikkialla. HSPB1:n pienin funktionaalinen yksikkö on dimeeri, missä  $\alpha$ -crystallin-domeeni mahdollistaa dimerisoitumiseen (Shy, Patzko 2011, Ylikallio et al. 2015). *HSPB8* (*heat-shock 22 kDa protein 8*)-mutaatiot aiheuttavat dominoivan CMT2:n lisäksi dHMNII (distaalinen hereditaarinen motorinen neuropatia, tyyppi II). Tunnetut mutaatiot ovat olleet missense-mutaatioita. Mutaatiot saattaisivat aiheuttaa aggregaatteja, jotka häiritisivät aksonaalista kuljetusta (Tang et al. 2005).

#### 2.3.4 Muita funktioita

*GJB1* (*Gap junction protein beta-1*, 32 kDa eli connexin32) aiheuttaa dominoivaa X-kromosomaalisesti periytyvää CMTX:ää. Oireet ovat pari ensimmäistä vuosikymmentä suhteellisen lieviä, jonka jälkeen ne pahenevat ja taudinkuva on usein vakava 60 ikävuoden jälkeen. Miehillä oireet alkavat yleensä noin 10-vuotiaana. Potilailla on etenevää lihasheikkoutta ja – katoa, jotka alkavat alaraajoista, mutta taudin edetessä ilmenevät myös käsissä. Sensorista katoa on myös usein. CMTX on yleensä naispotilailla lievempi kuin miespotilailla (Shy et al. 2007, Kleopa, Abrams & Scherer 2012). *GJB1*-mutaatioita tunnetaan satoja ja ne ovat missense- ja nonsense-mutaatioita sekä deleetioita eri alueilla geeniä. Oireiden vaikeusasteella ei ole löydetty yhteyttä tiettyihin mutaatioihin. Myöskään erityyppisillä mutaatioilla ei ole havaittu yhteyttä potilaan fenotyyppiin (Kleopa, Abrams & Scherer 2012). *GJB1*-geenissä on vain kaksi eksonia, vaikka sen koko on 1904 bp ja proteiinin 283 aa. *GJB1* ekspressoituu ääreishermoissa, mutta myös muualla elimistössä, kuten maksassa ja epiteelisoluissa. GJB1 kuuluu konneksiineihin, joita on nisäkkäillä n. 20 kpl. Ne ovat membraanien läpi meneviä proteiineja, jotka kasaantuvat muodostamaan aukkoliitoksia, kanavia, jotka avustavat ionien ja pienten molekyylien siirtoa solusta soluun. Kuusi konneksiini-alayksikköä muodostavat puolikanavan, joka on vuorovaikutuksessa naapurisolun puolikanavan kanssa ja ne

yhdessä muodostavat kokonaisen, intrasellulaarisen, kanavan. Näitä aukkoliitoksia on hermosoluissa ja monissa gliasoluissa. GJB1:n aminohapposekvenssi on hyvin konservoitunut. GJB1-mutaatioiden vaikutukset CMTX:ssä vaikuttavat ääreishermostoon, joten muut konnektiivit kenties korvaavat GJB1:n muualla elimistössä. GJB1-mutaatiot CMTX:ssä aiheuttavat sekä myeliinin hajoamista että aksonien vaurioitumista ja se luokitellaan usein ns. välimuotoiseksi CMT:ksi. Miehillä NCV on yleensä 30–40 m/s, naisilla 30–50 m/s. Muuntunut GJB1 ehkä vaikuttaa pienten molekyylien ja ionien diffuusioon ääreishermoston poikki myeliinikerroksessa, esimerkiksi kanavan läpimitan pieneneminen estäisi joidenkin molekyylien siirtymisen kanavan läpi (Bergoffen et al. 1993, Kleopa, Abrams & Scherer 2012).

*TRPV4 (transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 4)*-geenin mutaatiot aiheuttavat dominoivasti periytyvää CMT2:ta sekä luuston kehityshäiriöitä. Potilailla on motorispainotteiset oireet, lihasheikkoutta ja –katoa raajoissa sekä oireita myös palleassa ja kurkunpään lihaksissa. Alkamisikä ja vaikeusaste vaihtelevat paljon. Tunnetut mutaatiot ovat olleet missense-mutaatioita. TRPV4 on epäselektiivinen kationikanava, joka reagoi ympäristön ärsykkeisiin, kuten lämpötilaan, hypotoniaan ja tiettyihin kemikaaleihin. Se kuuluu TRP-kationikanavien superproteiiniperheeseen. TRPV4 ekspressoituu mm. liikehermosoluissa, mutta sen ekspressio on kaikkein suurinta rustokudoksessa. Toisaalta sen ekspressio on suhteellisen alhainen selkäytimen hermosoluissa. CMT2:ta aiheuttaneiden mutaatioiden mekanismi johtunee kohonneesta TRPV4-kanavan aktiivisuudesta, jolloin  $\text{Ca}^{2+}$  tulee soluun liikaa.  $\text{Ca}^{2+}$  on tärkeä solun sisäinen signaali hermosoluissa, säädellessä neuriittien uloskasvua, synapsien muodostumista, synaptista transmissiota sekä plastisiteettia. Liiallinen  $\text{Ca}^{2+}$  liittyykin neurodegeneraatioon. Toisaalta myös TRPV4:n epänormaalisti toimivat proteiini-interaktiot voisivat olla taustalla sairauden syntymisessä. Mutatoitunut TRPV4 on toksinen hermosoluviljelmille, joka liittyy siis luultavasti TRPV4-kanavan poikkeavaan aktiivisuuteen (Landourey et al. 2010).

Aminoasyyli-tRNA-syntetaasit (ARSs) liittyvät translaatiossa aminohapon tRNA-vastineelleen. Useat niistä liittyvät perinnöllisiin neuropatioihin, vaikka niitä ekspressoidaan kaikkialla. Ne ovat myös hyvin konservoituneita proteiineja. ARS-mutaatioiden patogeeniset mekanismit ovat toistaiseksi epäselviä. GARS (*Glycyl tRNA synthetase*)-mutaatiot aiheuttavat sekä dominoivasti periytyvää CMT2:ta että dSMA:ta (distaalinen spinaalinen lihasatrofia tyyppi V). Tunnetut mutaatiot ovat olleet missense-mutaatioita, konservoituneilla alueilla. GARS ekspressoituu laajasti ja joka paikassa, myös aivoissa ja selkäytimessä. Solussa GARS toimii sekä sytoplasmassa että mitokondrioissa. GARS:n toiminnallinen muoto on homodimeeri. Ainakin osa mutaatioista alentaa GARS:n entsyymiaktiivisuutta ja osa taas häiritsee dimeerin muodostamista. Entsyymiaktiivisuuden aleneminen

johtaisi translaation tehokkuuden heikkenemiseen, joten muodostuvat polypeptidit saattaisivat olla lyhyempiä tai polypeptidiin saattaisi tulla väärä aminohappo. Se ei välttämättä näkyisi fenotyyppissä muuten, mutta pitkät aksonit olisivat herkempiä tälle, koska proteiinituotteiden määrä juuri aksonien päissä vähenisi merkittävästi (Antonellis et al. 2003, Antonellis, Green 2008). *YARS* (*Tyrosyl t-RNA synthetase*)-mutaatiot aiheuttavat välimuotoista CMT:tä. Mutaatiot ovat dominoivia ja tyypiltään missense-mutaatioita ja deleetioita, jotka eivät muuta lukuraamia. Myös *YARS*:n funktionaalinen yksikkö on homodimeeri ja se sijaitsee sytoplasmassa (Antonellis, Green 2008).

*HINT1* (*histidine triad nucleotide-binding protein 1*) löytyi kun tutkittiin useita eurooppalaisia perheitä, joilla oli autosomaalisesti resessiivisesti periytyvää neuropatiaa ja neuromyotoniaa. Mutaatioita löytyi 8 kpl ja ne olivat joko homotsygoottisia tai yhdistelmäheterotsygoottisia (Zimon et al. 2012). Myöhemmin *HINT1*-mutaatioita on löytynyt myös muissa tutkimuksissa, joten ne saattavat olla suhteellisen yleisiä (Lassuthova et al. 2015). Potilailla, joilta löytyi *HINT1*-mutaatio, oli liikeoireita enemmän kuin tunto-oireita sekä aksonaalista neuropatiaa. Lisäksi löytyi neuromyotoniaa, joka tarkoittaa viivästynyttä lihasten rentoutumista tietoisien lihassupistuksen jälkeen. Se johtuu ääreishermoston motoristen aksonien ylikiihtyvyydestä. Heterotsygoottisten kantajien fenotyyppi oli normaali. Alkumisikä potilailla oli 3-25 vuotta ja keskimäärin oireet alkoivat 10-vuotiaana (Lassuthova et al. 2015, Zimon et al. 2012). *HINT1*-mutaatioista lähes kaikki sijaitsivat konservoituneilla alueilla. *HINT1*-geenissä on vain kolme eksonia ja geenin koko on 1081 bp. *HINT1* ekspressoituu kaikkialla. Se on homodimeerinen puriinifosforamidaasi, jonka koko on 126 aa. *HINT1* on tuumorisuppressori ja mukana apoptoottisissa reiteissä. Tunnettujen tautia aiheuttavien mutaatioiden alueet ovat lähellä entsyymin katalyyttistä ydintä. Mutaatiot heikentävät entsyymaattista aktiivisuutta: *HINT1*-mutantit eivät ekspressoitu ollenkaan, joka voisi johtua posttranslationalisesta hajotuksesta. *HINT1*-mutaatioiden tarkka patologinen mekanismi on kuitenkin epäselvä (Zimon et al. 2012).

## 2.4 Hereditäärinen spastinen paraplegia (HSP)

Hereditäärinen spastinen paraplegia (HSP) on kliinisesti ja geneettisesti heterogeeninen ryhmä sairauksia, joille yhteistä on etenevä spastisuus alaraajoissa. Sen yleisyys on 4,3–9,8/100 000 henkilöä Euroopassa. HSP voidaan jakaa yksioireiseen (*pure*) ja monioireiseen (*complex*) alatyyppeihin sekä vielä pienempiin alaryhmiin sairauteen liittyvän geenin lokuksen mukaan. HSP voi periytyä autosomaalisesti resessiivisesti, autosomaalisesti dominantisti tai X-kromosomaalisesti (Finsterer et al. 2012).

### 2.4.1 Oireet, hoidot ja ennuste

Kaikilla HSP-potilailla tyypillinen oire on etenevä, spastinen lihasheikkous kummassakin jalassa. Spastisuus tarkoittaa kasvanutta lihastonusta, joka ilmenee vastuksena kun raajaa taivutetaan passiivisesti. Spastinen lihasheikkous vaikeuttaa juoksemista, aiheuttaa kompurointia ja kävely muuttuu usein kankeaksi. Muita yleisiä HSP:n oireita ovat yliaktiiviset jännerefleksit, alaraajojen tuntohäiriöt (värinätunnon ja asentotunnon heikkeneminen) ja virtsatie-oireet (rakon yliaktiivisuus). Lihasheikkoutta voi myös olla. Taudin alkuvaiheessa ja usein myöhemminkin oireet rajoittuvat yläraajoihin. *Pes cavus* on 30–50% potilaista. Monioireisissa HSP-muodoissa on myös muita oireita edellisten lisäksi. Näitä voivat olla muut neurologiset häiriöt, kuten neuropatia, ataksia (tahdonalaisien liikkeiden koordinaation häiriö), epilepsia, näköhäiriöt ja kehitysvammaisuus, sekä systeemiset häiriöt kuten harmaakaihi ja kuurous. Oireet voivat alkaa milloin tahansa, mutta yleisimmin ne alkavat nuoruusiässä tai myöhemmin (Fink 2003a, Finsterer et al. 2012, Depienne et al. 2007).

HSP-potilailla lapsuuden kehitys on yleensä ollut normaali. Ensimmäiset oireet ovat jalkojen jäykkyys ja kävelyvaikeudet, jotka alkavat yleensä 10–40-vuotiaana. Oireet pahenevat, yleensä hyvin hitaasti, mutta joissain tapauksissa nopeasti. HSP:n alkamisikä, oireiden eteneminen ja laajuus vaihtelevat huomattavasti, myös sukulaisten välillä. Vaikeusaste vaihtelee lähes oireettomasta (10–20% potilaista) vaikeaan muotoon, jossa potilas tarvitsee pyörätuolia liikkumiseen (10–20% potilaista). Sairaus vaikeutuu usein taudin edetessä, mutta ei aina. HSP ei merkittävästi vaikuta eliniän odotukseen, mutta elinikä voi alentua muiden oireiden, esimerkiksi epilepsian, vuoksi. Parannuskeinoa ei ole, mutta hoitona ovat fysioterapia ja oireita helpottavat lääkkeet (Fink 2003a, Finsterer et al. 2012).

#### **2.4.2 Sairauden aiheuttava mekanismi**

HSP-potilailla on aksonirappeumaa erityisesti kortikospinaaliradan pitkissä aksoneissa, jotka vaurioituvat raajojen ääreisosista alkaen. HSP-potilailla on vain vähän neuronaalista solukuolemaa, eikä primaarista demyelinaatiota ole. Kortikospinaalirata on tärkein tahdonalaisia liikkeitä kontrolloiva keskushermoston reitti, joka alkaa liikeaivokuorelta ja jatkuu selkäytimessä. Kortikospinaaliradan hermot ovat ylempiä liikehermoja. Ne päättyvät selkäytimen loppuun ja muodostavat synapseja joko suoraan tai välillisesti alempien liikehermojen kanssa. Alemmat liikehermot muodostavat hermo-lihasliitoksia luurankoli hasten kanssa. Pisimpien kortikospinaaliradan aksonien vaurioituminen johtaa HSP:ssä tyypilliseen alaraajojen spastisuuteen. Kuten CMT:n kohdallakin, myös HSP:ssä keskeistä on aksonien suuri pituus, joka aiheuttaa haasteen aksonaaliselle kuljetukselle ja energiansaannille. HSP:hen liitettyjen geenien funktiot liittyvät usein mitokondrioiden toimintaan, aksonaaliselle kuljetukseen tai kortikospinaaliradan kehittymiseen (Blackstone, O'Kane & Reid 2011, Blackstone 2012).

#### **2.4.3 HSP:n jaottelu ja diagnostiikka**

HSP:n diagnosoinnissa hyödynnetään perhetaustaa, erilaisia tutkimuksia (esimerkiksi NCV, MRI eli magneettikuvaus ja EEG eli aivosähkökäyrä) ja geenitestejä. Oireiltaan HSP voi sekoittua muun muassa leukodystrofioihin, MS-tautiin, B<sub>12</sub>-vitamiinin puutokseen, ALS-tautiin ja mitokondriotauteihin. Erityisesti sporadisia tapauksia on vaikea tunnistaa. Neuropatologisesti tärkein löydös on aksonien rappeutuminen, joka on vakavinta aksonien terminaaliosissa. Neuronaalisten solujen rungot voivat olla vielä tallella. Aksonirappeumaa on eri hermosolutyypeissä, joille yhteistä on niiden suuri pituus (Finsterer et al. 2012).

HSP voidaan jakaa siis oireiden perusteella kahteen ryhmään: yksioireiseen ja monioireiseen. Oireiden vakavuusaste vaihtelee potilaittain. Eri alatyypeillä voi olla samanlaisia oireita ja alatyypien sisällä voi eri potilailla olla erilaisia oireita, jopa perheiden sisällä on eroja fenotyypeissä. Tarkempi luokittelu pelkästään oireiden perusteella onkin vaikeaa. Alatyyppejä voidaan luokitella myös periytymismallin mukaan. Sporadisia tapauksia on paljon. HSP:n alatyyppejä luokitellaan myös sairauden aiheuttaneen mutaation geenin lokuksen mukaan sekä sairauden alkamisiän mukaan aikaisin tai myöhään alkavaksi. Euroopassa yleisin muoto on yksioireinen, autosomaalisesti dominoivasti periytyvä HSP (Fink 2003b, Finsterer et al. 2012).

## 2.5 HSP:n genetiikka

HSP:n geneettisen tason diagnosointi on yleensä ollut korkeintaan yleisimpien HSP-geenien, kuten *SPAST* ja *ATL1*, sekvensoimista. Oireiden tai sukupuun kautta on ehkä osattu epäillä jotain tiettyä geeniä, joka on sekvensoitu. HSP:hen liitettyjä geenejä tunnetaan kuitenkin niin paljon, että muutamien geenien sekvensoimisella on vain harva potilas saanut geneettisen diagnoosin (Finsterer et al. 2012).

HSP:tä aiheuttavien mutaatioiden penetranssi on lähes täydellinen. Autosomaalisesti dominoiva, yksioireinen muoto on yleisin HSP:n muoto ja niitä on 70–80% kaikista HSP-tapauksista. Autosomaalisesti dominoivista tapauksista 40 % aiheutuu *SPAST*-mutaatioista, 10 % *ATL1*-mutaatioista ja 5 % *REEP1*-mutaatioista, muiden geenien osuudet ovat hyvin pieniä. Monioireiset muodot ovat useimmin autosomaalisesti resessiivisiä (Finsterer et al. 2012). HSP:hen liittyviä lokuksia tunnetaan jo 72 (SPG1-72) ja geenejä 55 (Lo Giudice et al. 2014). Tärkeimmät SPG-lokukset geeneineen ovat taulukossa 2. Autosomaalisesti dominoivaan HSP:hen liittyy ainakin 20 lokusta ja 12 geeniä. Autosomaalisesti resessiivisissä, monioireisissa muodoissa on runsaasti perhekohtaisia mutaatioita: lokuksia tunnetaan 48 ja geenejä 41. X-kromosomaalisesti dominoivaan muotoon liittyy vain 5 lokusta ja 3 geeniä.

**Taulukko 2: SPG-lokukset sekä tärkeimpien lokusten geenit. Fenotyyppi: Y = yksioireinen ja M = monioireinen HSP-muoto. Periytyminen: AD = autosomaalisesti dominoiva, AR = autosomaalisesti resessiivinen, X = X-kromosomaalinen periytyminen. Osa geeneistä on jätetty pois, sillä niihin liittyvistä mutaatioista suuri osa esiintyy vain yhdessä tai muutamassa perheessä.**

| Alatyyppe    | Lokus   | Geeni         |  | Fenotyyppi | Periytyminen |
|--------------|---------|---------------|--|------------|--------------|
| <b>SPG1</b>  | Xq28    | <i>L1CAM</i>  | L1 cell adhesion molecule  | M          | X            |
| <b>SPG2</b>  | Xq22.2  | <i>PLP1</i>   | Proteolipid protein 1  | Y/M        | X            |
| <b>SPG3A</b> | 14q22.1 | <i>ATL1</i>   | Atlantin GTPase 1  | Y/M        | AD           |
| <b>SPG4</b>  | 2p22.3  | <i>SPAST</i>  | Spastin  | Y/M        | AD           |
| <b>SPG5A</b> | 8q12.3  | <i>CYP7B1</i> | Cytochrome P450, Family 7, Subfamily B, Polypeptide 1                            | Y/M        | AR           |
| <b>SPG6</b>  | 15q11.2 | <i>NIPA1</i>  | Nonimprinted gene in Prader-Willi syndrome/Angelman syndrome chromosome region 1 | Y/M        | AD           |
| <b>SPG7</b>  | 16q24.3 | <i>SPG7</i>   | Paraplegin   | Y/M        | AR           |

|                 |               |                 |  |     |       |
|-----------------|---------------|-----------------|--|-----|-------|
| <b>SPG8</b>     | 8q24.13       | <i>KIAA0196</i> | Strumpellin  | Y   | AD    |
| <b>SPG9</b>     | 10q23.3-q24.1 | <i>SPG9</i>     |  | M   | AD    |
| <b>SPG10</b>    | 12q13.3       | <i>KIF5A</i>    | Kinesin family member 5A   | Y/M | AD    |
| <b>SPG11</b>    | 15q21.1       | <i>SPG11</i>    | Spatacsin  | M   | AR    |
| <b>SPG12</b>    | 19q13.32      | <i>RTN2</i>     | Reticulon 2  | Y   | AD    |
| <b>SPG13</b>    | 2q33.1        | <i>HSPD1</i>    | Heat-shock 60-kD protein 1;<br>Hsp60                             | Y/M | AD    |
| <b>SPG14</b>    | 3q27-q28      | <i>SPG14</i>    |  | M   | AR    |
| <b>SPG15</b>    | 14q24.1       | <i>ZFYVE26</i>  | Zinc finger fyve domain-<br>containing protein 26<br>(Spastizin) | M   | AR    |
| <b>SPG16</b>    | Xq11.2        | <i>SPG16</i>    |  | Y/M | X     |
| <b>SPG17</b>    | 11q12.3       | <i>BSCL2</i>    | BSCL gene (Seipin)   | M   | AD    |
| <b>SPG18</b>    | 8p11.23       | <i>ERLIN2</i>   | Endoplasmic reticulum lipid<br>raft-associated protein 2         | M   | AR    |
| <b>SPG19</b>    | 9q            | <i>SPG19</i>    |  | Y   | AD    |
| <b>SPG20</b>    | 13q13.3       | <i>SPG20</i>    | Spartin  | M   | AR    |
| <b>SPG21</b>    | 15q22.31      | <i>ACP33</i>    | Acidic cluster protein, 33-kD<br>(Maspardin, SPG21)              | M   | AR    |
| <b>SPG22</b>    | Xq13.2        | <i>SLC16A2</i>  | MCT8   | M   | X     |
| <b>SPG23-29</b> |               |                 |  | M   | AR/AD |
| <b>SPG30</b>    | 2q37.3        | <i>KIF1A</i>    | Kinesin family member 1A   | Y/M | AR    |
| <b>SPG31</b>    | 2p11.1        | <i>REEP1</i>    | Receptor expression-<br>enhancing protein 1                      | Y/M | AD    |
| <b>SPG32-72</b> |               |                 |  | Y/M | AR/AD |

HSP:hen liittyvät geenit osallistuvat muun muassa mitokondrioiden toimintaan (*SPG7*, *HSPD1*), aksonaaliseen kuljetukseen (*KIF5A*, *KIF1A*, *ATL1*), myeliiniin (*PLP1*) ja kortikospinaaliradan neuronien kehitykseen (*LICAM*). Mutaatiot voivat vaikuttaa myös ER-verkoston kautta aiheuttamalla häiriöitä ER:n putkimaisen verkoston muodostumiseen (*ATL1*, *REEP1*, *RTN2*, *ERLIN2*). HSP-geenit voivat liittyä myös lipidien synteesiin ja metaboliaan (*CYP7B1*) sekä BMP-signaalointiin,

joka säätelee aksonien kasvua ja synaptisia funktioita (*NIPA1*, *SPAST*, *ATL1*). Moni HSP-geeni liittyy useampaan funktionaaliseen ryhmään, sillä esimerkiksi *SPAST* on mukana aksonaalissa kuljetuksessa, ER:n morfologiassa, BMP-signaaloinnissa ja organellien muokkauksessa (Blackstone 2012, Lo Giudice et al. 2014). Seuraavissa kappaleissa esittelen yleisimpiä HSP:hen liittyviä geenejä funktionaalisiin ryhmiin jaoteltuna.

### 2.5.1 Mitokondriodynamiikka

Mitokondrioiden normaali toiminta ja riittävä määrä ovat tärkeitä, että hermosolut saisivat tarpeeksi energiaa. Häiriöt mitokondrioiden toiminnassa voivat johtaa niiden alentuneeseen määrään aksonissa ja tästä johtuviin ongelmiin.

*HSPD1* (*Heat Shock 60-kD protein 1* eli Hsp60)-mutaatiot aiheuttavat dominoivasti periytyvää yksioireista HSP:tä sekä leukodystrofiaa (aivojen valkeaan aineeseen liittyviä sairauksia). Mutaatiot ovat yleensä missense-mutaatioita. Hsp60 on mitokondriaalinen chaperoniproteiini, joka avustaa proteiinien laskostumista mitokondrioissa. Chaperoniproteiinien tehtäviin kuuluu väärinlaskostuneiden proteiinien aggregaation estäminen sitomalla niitä (Hansen et al. 2002).

*SPG7* eli paraplegiini liittyy resessiivisesti periytyvään yksioireiseen HSP:hen. *SPG7*-mutaatiot ovat deleetioita tai lukuraamia muuttavia mutaatioita, joista tuotetaan lyhentynyttä proteiinia. Nämä mutaatiot aiheuttavat tyypillisiä yksioireisen HSP:n oireita, jotka alkavat n. 25-vuotiaana. Joillakin potilailla on lisäksi oireina optinen ja/tai pikkuaivojen atrofia (näköhermon ja pikkuaivojen surkastuminen) (Casari et al. 1998). Paraplegiini on ATP-riippuvaisen AAA-proteaasin alayksikkö ja se sijaitsee mitokondrion sisäkalvolla. *SPG7*:n patogeeniset mutaatiot aiheuttavat häiriöitä mitokondrioiden hengitysketjussa. Mutaatiot vaikuttaisivat häiritsevän myös normaalia aksonaalista kuljetusta ja mitokondrioiden toimintaa. Paraplegiinin tehtäviin kuuluu myös ribosomien kokoaminen ja proteiinien laadun tarkkailu (Blackstone 2012).

### 2.5.2 Aksonaalisen kuljetuksen häiriöt

Toimiva aksonaalinen kuljetus, jossa kuljetetaan proteiineja, mitokondrioita ja muita solun organelleja, on hermosolujen normaalille toiminnalle elintärkeää. Mikrotubuluksiin perustuvassa kuljetuksessa dyneiini kuljettaa rahdin solukeskuksen suuntaan ja kinesiinit solukeskuksesta synapseihin. *SPAST*:n ja *ATL1*:n funktioista osa sopii myös tähän ryhmään, mutta ne käsitellään myöhemmin.



*KIF1A* (*kinesin family member 1A*)-geenissä on 49 eksonia ja proteiini on kooltaan 1791 aa. Homotsygoottiset missense-mutaatiot *KIF1A*:n moottoridomeenissa aiheuttavat resessiivisesti periytyvää monioireista HSP:tä. Lisäksi *KIF1A*:n homotsygoottiset nonsense-mutaatiot aiheuttavat HSANII:ta (Hereditääriin sensorinen ja autonominen neuropatia, tyyppi IIC). HSAN:ia aiheuttavissa mutaatioissa yleensä puuttuu proteiinin C-terminaalinen osa. Resessiivisten *KIF1A*-mutaatioiden aiheuttamissa HSP-tapauksissa on oireina spastinen käynti ja lihaskato raajojen ääreisosissa. Lisäksi potilailla voi olla sensorista neuropatiaa ja pikkuaivoihin liittyvää ataksiaa. Alkamisikä on ollut yleensä 12–21 vuotta ja sairauden eteneminen on ollut hidasta (Klebe et al. 2012, Klebe et al. 2006). *KIF1A* kuuluu kinesiini-3-proteiiniperheeseen. Ne ovat mikrotubulusriippuvaisia molekyylimoottoreita, jotka ovat mukana membraanivesikkelien, proteiinikompleksien ja mRNA:n kuljetuksessa neuriiite- ja pitkin, joten niillä on tärkeä rooli hermojen toiminnassa. Ne käyttävät ATP:tä energianlähteenä liikuttaakseen rahtia mikrotubuluksia pitkin. *KIF1A* on neuronispesifinen moottoriproteiini. Se kuljettaa presynaptisia vesikkeleitä kohti aksonaalisten mikrotubulusten distaalisia plus-päitä, joten se on mukana synaptisessa plastisuudessa ja transmissiossa sekä oppimisessa ja muistin toiminnassa. *KIF1A*:ssa on N-terminaalinen moottoridomeeni. *KIF1A*:n ATP-hydrolyysi aiheuttaa konformaatiomuutoksia moottoridomeenin kahdessa tärkeässä rakenteessa ja sitoutuu mikrotubuluksiin. Tunnetut mutaatiot vaikuttavat *KIF1A*:n toimintaan vaikeuttamalla sen sitoutumista mikrotubuluksiin ja moottoridomeenin kykyyn siirtyä neuriiittien kaukaisimpiin osiin. Dominantit mutaatiot vaikuttavat siis ilmeisesti dominantti negatiivisesti ja resessiiviset lievempinä ovat mekanismiltaan loss-of-function-mutaatioita (Klebe et al. 2012, Lee et al. 2015).

*KIF5A* (*kinesin family member 5A*)-geenin mutaatiot aiheuttavat dominoivasti periytyvää yksioireista HSP:tä. Potilailla on oireina epänormaalia käyntiä lapsuudesta asti, alaraajojen hyperrefleksiaa, *pes cavus*, rakko-oireita ja skolioosia. Yläraajoissa on usein myös oireita ja osalla potilaista saattaa olla lisäksi neuropatiaa. Tunnetut mutaatiot ovat missense-mutaatioita. *KIF5A* ekspressoituu vain neuronaalisissa kudoksissa. Sillä on tärkeä tehtävä hitaassa neurofilamenttien aksonaalisessa kuljetuksessa, joka on riippuvainen mikrotubuluksista. *KIF5A* kuuluu kinesiiniin proteiiniperheeseen, joilla on monenlaisia funktioita solussa, kuten vesikkelien ja organellien kuljetus, tumasukkulan muodostus ja mikrotubuluksien dynamiikka (Fichera et al. 2004).

### 2.5.3 ER-verkoston toiminta

Endoplasmakalvostolla (ER) on paljon tehtäviä. Hermosoluissa se on erityisen tärkeä aksonien ja dendriittien syntymisessä ja se toimii myös  $\text{Ca}^{2+}$ -varastona. HSP:hen liittyvissä geneeissä on monia,

jotka ovat mukana ER-verkoston toiminnassa ja muokkaamisessa. ATL1 on interaktioissa ER:ää muokkaavien retikulonien ja DP1/Yop1p:n kanssa. ATL1:llä on interaktioita myös SPAST:n kanssa, jonka funktioihin kuuluu muun muassa mikrotubuluksien katkaiseminen, millä on vaikutusta aksonien haaroittumisessa ja pidentämisessä. ATL1:llä on interaktioita myös REEP1:n kanssa, joka välittää interaktioita ER:n ja mikrotubulusten välillä. REEP1, ATL1 ja SPAST yhdessä koordinoivat ER:n putkien muokkausta ja ER:n ja mikrotubulusten interaktioita putkimaisen (tubular) ER:n muodostamiseksi. Retikulonit, joihin RTN2 kuuluu, muodostavat myös putkimaista ER:ää ja se on interaktiossa SPAST:n kanssa. ER:ään liittyvät HSP-geenit siis yhdessä säätelevät polarisoitua membraania ja proteiinien kuljetusta mikrotubuluksia pitkin solun kaukaisiin kohtiin. Häiriöt näissä prosesseissa vaikuttaisivat erityisesti pitkiin aksoneihin, kuten kortikospinaaliradan aksoneihin (Montenegro et al. 2012, Park et al. 2010).

*ATL1 (atlastin GTPase 1)*-geenissä on 14 eksonia. Proteiini on atlastiini, jonka koko on 553 aa. *ATL1*-mutaatiot aiheuttavat yksioireista dominoivasti periytyvää HSP:tä sekä HSN1:tä (hereditääriinen sensorinen neuropatia, tyyppi 1D). *ATL1*-mutaation aiheuttama HSP alkaa yleensä 20 ikävuoteen mennessä, useimmilla jo 10 ikävuoteen mennessä. *ATL1*-mutaatiot aiheuttavat 10 % autosomaalisesti dominoivista HSP-tapauksista ja ne ovat yleisin syy lapsena alkavaan HSP:hen. *ATL1*-mutaatioita tunnetaan lukuisia, eri osissa geeniä, ja ne ovat lähes kaikki missense-mutaatioita. *ATL1* ekspressoituu eniten keskushermostossa (Zhao et al. 2001, Namekawa et al. 2006). ATL1 kuuluu proteiiniperheeseen *Dynamin family of large guanosine triphosphatases (GTPases)*. Se on GTPaasi putkimaisessa ER:ssä ja sillä on interaktioita ER:ää muokkaavien retikulonien ja DP1/Yop1p:n kanssa. *ATL1*-mutaatiot vaikuttavat luultavasti dominantti negatiivisesti, sillä muutunut proteiini häiritsee putkimaisen ER-verkoston muodostamista ja estää aksonien pidentämistä neuroneissa. Useat tunnetut *ATL1*-mutaatiot myös häiritsevät Golgin normaalia toimintaa, joten ATL1 on mukana myös vesikkelikuljetuksessa ER:n ja Golgin välillä. ATL1 on interaktioissa myös muiden HSP-proteiinien, SPAST:n ja REEP1:n kanssa ja ne yhdessä koordinoivat ER-tubulusten muokkausta ja ER:n interaktioita mikrotubulusten kanssa ER-verkoston muodostamisessa. Ne säätelevät polarisoitua membraania sekä proteiiniliikennettä mikrotubuluksia pitkin (Namekawa et al. 2007, Park et al. 2010).

*REEP1 (receptor accessory protein 1)* -mutaatioiden osuus autosomaalisesti dominoivasti periytyvästä HSP:tä on noin 5 % (Finsterer et al. 2012). *REEP1*-mutaatiot aiheuttavat yksioireista HSP:tä. *REEP1*-mutaation aiheuttama HSP alkaa yleensä lapsuudessa. Mutaatioita tunnetaan erityyppisiä: deleetioita, silmukointimutaatioita sekä missense-mutaatioita ja 'UTR-muutoksia. Mutaatiot johtavat haploinsuffiensiin. *REEP1* ekspressoituu laajasti, myös hermoissa (Zuchner et al. 2006).

REEP1 on ER-proteiini ja kuuluu DP1/Yop1-superproteiiniperheeseen. REEP-proteiineja tunnetaan myös REEP2-6. REEP1 välittää interaktioita putkimaisen ER:n ja mikrotubulusten välillä sytoskeletonissa ja se on interaktioissa ATL1:n ja SPAST:n kanssa. REEP1:n lyhentyneet mutanttimuodot eivät sido mikrotubuluksia ja rikkovat ER-verkoston (Park et al. 2010).

*RTN2 (reticulon 2)*-mutaatiot aiheuttavat dominoivasti periytyvää yksioireista HSP:tä. *RTN2*-mutaatioiden aiheuttama HSP alkaa yleensä 25 ikävuoteen mennessä ja oireet ovat tyypillisiä HSP-oireita. Mutaatioita tunnetaan insertioita ja deletioita, jotka aiheuttavat yleensä lukuraamin muutoksen ja ennenaikaisen STOP-kodonin. Deleetiot aiheuttavat yleensä vakavamman taudinkuvan. *RTN2* kuuluu proteiiniperheeseen *Reticulon family of prototypic ER-shaping proteins*. Retikulonit muokkaavat ER:ää, ne muodostavat ER:n reunojen käyristymiä RHD-domeeninsa (reticulon homology domain) avulla. *RTN2*-mutaatiot aiheuttavat haploinsuffisienssin (Montenegro et al. 2012).

*ERLIN2 (endoplasmic reticulum lipid raft-associated protein 2)*-mutaatiot aiheuttavat resessiivisesti periytyvää monioireista HSP:tä. *ERLIN2*-mutaatioiden aiheuttamat oireet alkavat varhain lapsuudessa. Pahenevan spastisuuden lisäksi oireina on kehitysvammaisuutta, afasiaa (aivolähtöinen puhehäiriö) ja epileptisiä kohtauksia. *ERLIN2*:n patogeenisista mutaatioista tunnetaan deletio, joka aiheutti ensimmäisen eksonin puuttumisen sekä lukuraamin muutoksen aiheuttanut insertio. *ERLIN2* on ER:ään liittyvän hajotusreitin, ERAD:n, komponentti. ERAD-reitti (Endoplasmic reticulum degradation) on monivaiheinen prosessi, jossa hajotetaan viallisia proteiineja sekä tiettyjä toimivia proteiineja homeostaasiin liittyen. *ERLIN2* kuuluu proteiiniperheeseen *SPFH-domain containing proteins*. Ne yhdistyvät suuriksi oligomeerikomplekseiksi ja sijoittuvat kolesterolirikkaisiin membraaneihin. *ERLIN2* on ERAD-välittäjänä muun muassa IP3R:lle (inositoli-1,4,5-trifosfaatti(IP3) reseptorit). Toimimaton *ERLIN2* heikentää IP3R:n hajotusta, joka johtaa IP3-signaloinnin ja kanavien yhtämittaiseen aktivaatioon ja siten neuronien hyperaktiivisuuteen (Alazami et al. 2011).

#### **2.5.4 BMP-signaointi**

BMP (*Bone morphogenetic proteins*)-signaointi on tärkeää aksonien toiminnalle. Kehityksen aikana BMP-signaointi säätelee aksonien kasvua, ohjausta ja erilaistumista. BMP-signaointia inhiboivat HSP-geeneistä ainakin *ATL1*, *NIPA1* ja *SPAST* (Tsang et al. 2009, Blackstone 2012).

*SPAST (spastin)*-geenissä on 17 eksonia. *SPAST*-mutaatiot aiheuttavat 40–50% autosomaalisesti dominoivista HSP-tapauksista (Hazan et al. 1999). *SPAST*-mutaatioiden aiheuttamassa HSP:ssä

keskimääräinen alkamisikä on 29 vuotta, vaikkakin se vaihtelee huomattavasti. Oireet ovat tyypillisiä yksioireisen HSP:n oireita. Vaikeusaste vaihtelee paljon eri potilailla. Joillakin SPAST-potilailla on lisäksi havaittu kognitiivisia häiriöitä, epilepsiaa ja pikkuaivoihin liittyviä oireita, jotka viittaisivat monioireiseen HSP:hen (Fonknechten et al. 2000, Depienne et al. 2006, McDermott et al. 2006). SPAST-mutaatioita tunnetaan runsaasti kaikista eksoneista ja kaikenlaisia mutaatiotyyppisiä: deleetioita, insertioita, lukuraamia muuttavia mutaatioita, missense- ja nonsense-mutaatioita sekä silmukointimutaatioita, mutta mutaation tyyppillä ei ole havaittu olevan yhteyttä oireisiin tai vaikeusasteeseen. On spekuloitu, että kaikki SPAST-mutaatiot olisivat patogeenisia, koska koko geeni on hyvin konservoitunut, eikä polymorfismeja juuri tunneta. Suurin osa mutaatioista on kullekin perheelle spesifisiä mutaatioita (Fonknechten et al. 2000, Depienne et al. 2006, McDermott et al. 2006). SPAST koodaa spastiinia, joka kuuluu AAA-proteiiniperheeseen (ATPases associated with diverse cellular activities). AAA-proteiinit sisältävät AAA-kasetti-domeenin. AAA-proteiinit ovat mukana solun prosesseissa, jotka liittyvät proteiinien hajotukseen, vesikkelivälitteiseen proteiinien kuljetukseen, solusyklin säätelyyn, organellien rakentumiseen ja geeniekspressioon (Hazan et al. 1999). Spastiini on 616 aa ja 67,2 kDa. Isoformeja on kaksi, N-terminaaliosasta lyhentynyt isoformi, joka sijaitsee tumassa ja sytoplasmassa sekä täyspitkä isoformi, jota kuljetetaan aktiivisesti tumasta sytoplasmaan. SPAST ekspressoituu kaikkialla. Spastiinilla on monia funktioita. Se katkaisee mikrotubuluksia, mikä vaikuttaa aksonien haaroittumiseen ja pidentymiseen neuroneissa (Park et al. 2010, Sanderson et al. 2006). SPAST myös inhiboi BMP-signaalointia, joka on tärkeää aksonien toiminnalle (Tsang et al. 2009). Lisäksi SPAST vaikuttaa ER:n morfologiaan. SPAST on interaktioissa ATL1:n, RTN2:n ja REEP1:n kanssa, interaktioihin osallistuu ilmeisesti vain SPAST:n täyspitkä isoformi. Ne säätelevät polarisoitua membraania ja proteiiniliikennettä mikrotubuluksia pitkin. Sairauden aiheuttava mekanismi on haploinsuffisienssi (Park et al. 2010, Sanderson et al. 2006).

*NIPAI (Nonimprinted gene in Prader-Willi syndrome/Angelman syndrome chromosome region 1)-* mutaatiot aiheuttavat dominoivasti periytyvää yksioireista HSP:tä. *NIPAI*-mutaation aiheuttama HSP alkaa keskimäärin 17-vuotiaana, mutta alkamisikä vaihtelee huomattavasti. Oireet ovat tyypillisiä HSP-oireita, kuten jalkojen spastisuus. Osalla potilaista on myös muita oireita: joillakin toimintakyky on vakavasti heikentynyt ja voi olla lieviä muistivaikeuksia (Klebe et al. 2007). *NIPAI* inhiboi BMP-signaalointia luultavasti tehostamalla BMP-reseptorin, BMPRII:n, hajotusta lysosomeissa. *NIPAI*-mutaatiot ovat missense-mutaatioita ja sairausmekanismi lienee gain-of-function. *NIPAI*-mutaatio vaikuttaa proteiinin liikkumiseen niin, että se jää ER:ään kiinni. Ilmeisesti mutatoitunut *NIPAI* säätelee reseptoria huonommin kuin normaalisti toimiva proteiini (Tsang et al. 2009).

### 2.5.5 Endosomien Membraaniliikenne

*KIAA0196*, eli strumpelliini liittyy dominoivasti periytyvään yksioireiseen HSP:hen, joka alkaa aikuisiällä, useimmiten 20–30-vuotiaana. Oireet ovat tyypillisiä HSP-oireita. Tunnetut mutaatiot ovat kaikki missense-mutaatioita. *KIAA0196*-geenissä on 28 eksonia ja siitä tuotettu proteiini on 1159 aa. *KIAA0196* vaikuttaisi ekspressoituvan kaikkialla, myös aivojen kaikissa osissa. *KIAA0196* on hyvin konservoitunut ja se löytyy myös muilta selkärankaisilta. Sitä ei ole voitu yhdistää mihinkään ennestään tunnettuun proteiiniperheeseen (Valdmanis et al. 2007). *KIAA0196* on WASH-kompleksin (The Wiskott-Aldrich Syndrome protein and scar Homolog) osa, joka yhdistää putkimaisia endosomeja sekä vaikuttaa sytoskeletoniin ja kuljetukseen. WASH-kompleksiin kuuluu yhden *KIAA0196*:n lisäksi neljä muuta proteiinia (*Wash1*, *FAM21*, *KIAA1033*, *ccdc53*) sekä avustavia proteiineja. *KIAA0196*:n tarkkaa tehtävää kompleksissa ei tunneta. Monet reseptorit lajitellaan pois aikaisista endosomeista putkimaisissa kuljetusvälittäjissä, mitä WASH-kompleksi on mukana käynnistämässä. WASH-kompleksin häiriö johtaa putkimaisten endosomien määrän lisääntymiseen. WASH-kompleksin kutsuu endosomeille retromeeri-proteiini-kompleksi. Luultavasti mutaatio *KIAA0196*:ssa vaikuttaa kuitenkin jollain tavalla WASH-kompleksin toimintaan, vaikka mekanismia ei toistaiseksi tunneta. *KIAA0196* ja WASH-kompleksi ovat ehkä myös mukana BMP-signaaloinnissa (Freeman, Seaman & Reid 2013). *KIAA0196*:lla on interaktioita myös *VCP*:n (*valosin-containing protein*) kanssa, joka liittyy moneen neurodegeneratiiviseen sairauteen, kuten *IBMPFD*:hen (Inclusion Body Myopathy associated with Paget disease of bone and Frontotemporal Dementia). *VCP*:llä on runsaasti tärkeitä funktioita solussa, liittyen esimerkiksi solusykliin, apoptoosin estämiseen ja DNA:n vaurioitumisen vasteeseen. *KIAA0196*-mutaatiot aiheuttavat ehkä aksonien uloskasvun hidastumista sekä häiriöitä endosomaaliseen kuljetukseen (Clemen et al. 2010).

### 2.5.6 Primaarinen myeliinihäiriö

*PLP1* (*proteolipid protein 1*)-mutaatiot aiheuttavat X-kromosomaalisesti dominoivasti periytyvää HSP:tä sekä Pelizaeus-Merzbacherin tautia (PMD). Näillä kahdella sairaudella on samankaltaisia oireita ja lievin muoto on yksioireinen HSP. *PLP1*-mutaation aiheuttamassa HSP:ssä on tyypillisiä HSP-oireita. Osalla potilaista voi olla myös silmävärvettä ja hypotoniaa lapsena. Oireet alkavat usein lapsuudessa, keskimäärin 3-vuotiaana. Sairauden vaikeusaste vaihtelee paljon eri potilailla. Mutaatiot ovat missense-mutaatioita. Naispuolisilla mutaation kantajilla voi olla HSP-oireita, mutta ne ovat usein lieviä. *PLP1* ekspressoituu eniten oligodendrosyyteissä. *PLP1* muodostaa 50 % myeliiniproteiinista, joten se vakauttaa ja ylläpitää myeliinituppea ja sillä on tärkeä tehtävä aksonien ja

myeliinin interaktioissa. PLP1:stä on myös vaihtoehtoisesti silmukoitu transkripti, joka on mukana oligodendrosyyttien kypsymisessä (Svenstrup et al. 2010).

### 2.5.7 Kortikospinaaliradan kehityshäiriöt

*L1CAM (L1 cell adhesion molecule)*-mutaatiot aiheuttavat monioireista X-kromosomaalista HSP:tä ja lisäksi MASA-syndroomaa (Mental retardation, Aphasia, Shuffling gait, Adducted thumbs) sekä HSAS:ia (Hydrocephalus due to Stenosis of the Aqueduct of Sylvius). Näillä kaikilla sairauksilla on yhteisiä oireita HSAS:n ollessa vakavin taudinkuvaltaan. SPG1-potilailla on tavallisten HSP-oireiden lisäksi kehitysvammaisuutta, optista atrofiaa ja puheen ongelmia. HSP:hen liittyvä mutaatio on deleetio, joka aiheuttaa ennenaikaisen STOP-kodonin ja lyhentyneen proteiinin. HSAS-potilailla on myös deleetioita, kun taas MASA-potilailla on missense-mutaatioita. L1CAM on solun pinnan glykoproteiini. Se ekspressoituu eniten postmitoottisten neuronien aksoneissa. L1CAM kuuluu proteiiniperheeseen *Immunoglobulin family of cell adhesion molecules* (CAMs). CAM-verkosto on tärkeä neuronien vaeltamisessa, erilaistumisessa sekä ääreishermostojen myelinaatiossa ja uudistumisessa. L1CAM on mukana neuronaalisessa vaelluksessa ja neuriittien uloskasvussa kehityksen aikana. Se edistää neuronaalisten solujen adheesiota ja interaktioita muiden CAM:ien kanssa. L1CAM vaikuttaa signaalitransduktion kautta, jossa tapahtuu muutoksia toisiolähettiläisten määrissä, kinaasiaktiivisuudessa ja mikrotubulusten osien mukautumisessa. L1CAM on luultavasti mukana myös kortikospinaaliradan kehityksessä, joka olisi taustalla sairastumisessa HSP:hen (Jouet et al. 1994).

### 2.5.8 Lipidien synteesi ja metabolia

*CYP7B1 (Cytochrome P450, Family 7, Subfamily B, Polypeptide 1)*-mutaatiot aiheuttavat resessiivisesti periytyvää monioireista HSP:tä ja sen osuus autosomaalisesti resessiivisistä HSP-tapauksista on noin 5 %. *CYP7B1*-mutaation aiheuttama HSP alkaa keskimäärin 16,4-vuotiaana, vaikka alkamisikä vaihtelee paljon. Oireet ovat tyypillisiä HSP:n oireita ja monilla potilailla taudinkuva on vakava. *CYP7B1*-mutaatiot ovat missense- ja nonsense-mutaatioita. *CYP7B1* osallistuu kolesterolin ja sen johdannaisten metaboliaan ja on maksassa osa sappihappotuotannon vaihtoehtoista reittiä. *CYP7B1* ekspressoituu myös aivoissa, jossa se osallistuu neurosterolien ja oksisterolien metaboliaan. Neuronit saattavat olla herkkiä kolesterolin homeostaasin häiriöille ja toisaalta väärät oksisterolitasot saattaisivat olla haitallisia hermostolle (Goizet et al. 2009).

## 2.6 Kohdennettu uuden sukupolven sekvensointimenetelmä

Uuden sukupolven sekvensointimenetelmät (NGS, next-generation sequencing) perustuvat uudempiin sekvensointitekologioihin, joilla on mahdollista sekvensoida aikaisempaa runsaasti enemmän DNA-sekvenssejä ja huomattavasti nopeammin ja edullisemmin (massive parallel sequencing), kuin ns. ensimmäisen sukupolven menetelmällä eli automatisoidulla Sanger-sekvensoinnilla. Kohdennettussa NGS:ssä sekvensoidaan koko genomin (WGS, Whole genome sequencing) sijaan vain haluttu geenialue. Sen yksi sovellus on eksomin sekvensointi, WES (Whole exome sequencing). Diagnostisena menetelmänä voidaan sekvensoida tiettyihin sairauksiin liittyvien geenien kaikki halutut alueet. Kaikki genomin koodaavat eksonit sisältävät vain noin 1 % koko genomista. Kun keskitytään vain tiettyihin geenialueisiin, osuus genomista tippuu huomattavasti pienemmäksi, jolloin sen sekvensointi ja analysointi on ajallisesti ja rahallisesti kannattavaa. Kohdennettu NGS soveltuu erinomaisesti heterogeenisille sairauksille niiden diagnosoimiseen.

### 2.6.1 Uuden sukupolven sekvensointimenetelmät

Uuden sukupolven sekvensointimenetelmät perustuvat uudempiin sekvensointilaitteisiin, joissa on yhdistetty biokemialliset reaktiosarjat, fluoresenssikuvantaminen ja tietojenkäsittely. Sanger-sekvensointiin verrattuna kustannukset ovat huomattavasti halvemmat ja sekvensointi on paljon nopeampaa. Yksittäiset sekvensointireaktiot on rinnakkaistettu, jolloin on mahdollista analysoida samaan aikaan miljoonia DNA-fragmentteja. Samalla kerralla voidaan sekvensoida jopa 43 miljardia lyhyttä DNA-fragmenttia (yhden fragmentin pituus 25–500 emästä). Tekniikoita ja alustoja on erilaisia. Ne ovat erilaisia yhdistelmiä templaatin valmistelua, sekvensointia, kuvantamista sekä rinnastusta referenssisekvenssiin, varianttien löytämistä ja niiden annotointia. Eri sekvensointialustat soveltuvat parhaiten erilaisiin tarkoituksiin kukin ja jokaisella alustalla on omat ongelmansa (Bamshad et al. 2011, Goh, Choi 2012, Myllykangas, Koskenvuo & Alastalo 2013).

Yleisellä tasolla templaatin valmisteluun kuuluu genomisen DNA:n katkominen fragmenteiksi, johon käytetään esimerkiksi restriktioentsyymejä. Fragmentit kiinnitetään kiinteälle alustalle, joka mahdollistaa suurten fragmenttimäärien samanaikaisen sekvensoinnin. Templaattit myös yleensä monistetaan ennen sekvensointia. Usein fragmentteihin lisätään linkkeri- tai adapterisekvenssit. NGS-sekvensoinnissa käytetään yleensä leimattuja, usein fluoresenssileimattuja, nukleotideja. Fluoresoivan nukleotidin lisäämisen jälkeen se kuvataan ja poistetaan kuvaamisen aikana tai sen jälkeen (Metzker 2010).

Sekvensointialustoista CRT (Cyclic reversible termination) on syklinen metodi. Siinä DNA-polymeraasi lisää aina vain yhden fluoresoivan nukleotidin, joka kuvataan. DNA-synteesi keskeytyy, lisätty nukleotidi poistetaan kuvaamisen jälkeen ja sykli jatkuu uudestaan alusta. Tähän menetelmään perustuu Illumina/Solexa Genome Analyzer, joka käyttää kiinteällä alustalla PCR-amplifioituja DNA-fragmenttiklustereita ja neljää väriä kuvantamisessa. Se lienee myös laajimmin käytössä oleva NGS-sekvensointialusta. Helicos BioSciences käyttää myös tätä tekniikkaa, mutta templaattina ovat yksittäiset DNA-fragmentit ja kuvantamisessa käytetään vain yhtä väriä. SBL-menetelmä (Sequencing by Ligation) käyttää apunaan DNA-ligaasia. Siinä fluoresoiva koetin hybridisoituu komplementaariseen sekvenssiin templaatin vieressä ja DNA-ligaasi liittää koettimen templaatin alukkeeseen. Fluoresenssikuvauksen jälkeen koetin tai aluke poistetaan ja sykli alkaa uudestaan alusta. Tähän menetelmään perustuu Life/APG's SOLiD 3 – alusta, jossa templaattit monistetaan PCR:llä. Pyrosekvensoinnissa (pyrosequencing) muunneltuja eivät ole nukleotidit, vaan DNA-polymeraasi. Jokainen DNA-polymeraasin lisäämä nukleotidi aiheuttaa pyrofosfaatin vapautumisen, joka muutetaan entsyymaattisilla reaktioilla valoksi. Pyrosekvensoinnissakin lisätään yksi nukleotidi kerrallaan ja sen aiheuttaman valopiikin intensiteetti mitataan. Tässä menetelmässä lisätyt nukleotideja ei poisteta. Pyrosekvensointia käyttää Roche/454's GS FLX Titanium-alusta. *Real-time sequencing*-menetelmässä DNA-synteesiä kuvataan reaaliajassa, eli DNA-synteesi ei keskeydy kuten muissa menetelmissä, ja lisättävät nukleotidit ovat fluoresenssileimattuja (Metzker 2010, Mardis 2008).

## **2.6.2 Kohdennettu uuden sukupolven sekvensointimenetelmä**

Kohdennetussa NGS-sekvensoinnissa sekvensoidaan vain tutkimuksen tai diagnosoinnin kannalta oleelliset geenialueet, eikä koko genomia. Koko genomien sekvensointi on edelleen kallista ja sen analysoiminen työlästä, joten aikaa menee viikkoja. WES on vain noin 10 % WGS:n hinnasta, mutta sekin on usein diagnostiseen tarkoitukseen liian kallis menetelmä ja sen analysointi hidasta. Jos koko eksomin sijasta sekvensoidaan vain tietyt geenit, kustannukset ovat vain noin 1 % WGS:stä ja lisäksi sekvensointi on huomattavasti nopeampaa. Sekvensoinnin luotettavuus myös kasvaa, koska luenta keskitetään suppeammalle alueelle ja sen ansiosta lukupeitto kasvaa. Keskittäminen vähentää lisäksi näytteiden laatuvariaatioiden aiheuttamia luotettavuusongelmia. Ja kun halutaan sairaudelle geneettinen syy, voidaan sekvensoida vain kyseiseen sairauteen liittyvät geenit ja keskittyä niiden analysoimiseen, WES:ssä kun saataisiin turhaakin dataa (Sulonen et al. 2011, Myllykangas, Koskenvuo & Alastalo 2013).



Genominen DNA fragmentoidaan ja haluttu kohde täytyy rikastaa ennen sekvensoimista. Rikastaminen voidaan tehdä hyödyntämällä mikrodropletteja, mikrosiruja, liuosperusteista (solution-based) hybridisaatiota, biotinyloitua RNA:ta ja magneettihelmiä. Tarkoituksena on siis pyydystää halutut kohteet genomista esimerkiksi hybridisaatiolla biotinyloituun RNA:han, pestä muu DNA pois ja monistaa vain pyydystetty kohde. Rikastaminen vähentää työmäärää sekä tarvittavan DNA:n määrää (Sulonen et al. 2011, Bamshad et al. 2011).

### 2.6.3 Sekvensointitulosten analysoiminen

Sekvensoinnin jälkeen sekvenssit rinnastetaan erilaisten algoritmien avulla referenssisekvenssiin, etsitään referenssistä poikkeavat emäkset sekä annotoidaan ja tunnistetaan ne. Tämä vaihe tehdään yleensä erilaisilla analyysiohjelmistoilla (Bamshad et al. 2011).

Ihmisen genomissa on runsaasti harmittomia yhden nukleotidin polymorfismeja (SNP, single nucleotide polymorphism). Analysoinnin yhtenä haasteena on erottaa haitattomat muutokset tautia aiheuttavista mutaatioista. Geenipaneelisekvensoinnissa lähtökohtaisesti kaikki sekvensoidut geenit liittyvät tutkittuun sairauteen. WES:ssä joudutaan tutkimaan geenien funktioita ja miettimään, sopivatko ne tutkitun sairauden patogeneesiin mekanismeihin. Yleensä ajatellaan, että tautia aiheuttavan mutaation tulisi muuttaa aminohappoa (nonsynonymous). Usein hyödynnetään eksomitietokantoja, joista saadaan tieto variantin yleisyydestä. Esimerkiksi harvinaisen sairauden kohdalla voidaan olettaa, että sairautta aiheuttavan mutaationkin täytyy olla hyvin harvinainen. Tietokantoja on nykyisin jo useita, esimerkiksi 1000 Genomes Project (<http://browser.1000genomes.org/index.html>) ja Exome Variant Server (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>). Vastaavalla tavalla voidaan käyttää terveiden henkilöiden sekvenssejä kontrolleina. Ihanteellisinta on verrata potilaiden tuloksia saman populaation terveisiin henkilöihin, koska usein varianttien yleisyydessä on populaatiokohtaisia eroja. Voidaan myös arvioida mutaation haitallisuutta proteiinille, jossa apuna on useita ohjelmia, jotka ennustavat mutaatioiden haitallisuutta, kuten ohjelmat SIFT Genome Tool ([http://sift.jcvi.org/www/SIFT\\_chr\\_coords\\_submit.html](http://sift.jcvi.org/www/SIFT_chr_coords_submit.html)) ja PolyPhen 2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>). Kattavaa mutaatiotietokantaa ei ole, mutta useilla perinnöllisillä sairausryhmillä on omat mutaatiotietokantansa. Analysointiin vaikuttaa myös se, etsitäänkö homotsygoottista vai heterotsygoottista mutaatiota. Perinnöllisissä sairauksissa potilaan sukulaisten sekvensoinnista on myös paljon hyötyä. Mutaation vaikutuksia arvioidessa voidaan lisäksi miettiä, onko aminohappo konservoitunut ja kuinka merkittävä aminohapon muutos on proteiinin toiminnan kannalta (Bamshad et al. 2011, Hoyer et al. 2014, Lim et al. 2014).

#### 2.6.4 Kohdennetun NGS:n haasteet ja virhelähteet

Kuten WGS:n kohdalla, kohdennetussa NGS:ssäkin osa halutusta alueesta jää sekvensoimatta. Se johtuu esimerkiksi siitä, ettei kyseisellä alueella ole sopivaa restriktiokohtaa (jos menetelmä perustuu restriktioon). Teoriassa kaikki alueet voidaan saada sekvensoitua, jos koettimien suunnitteluun ja testaukseen panostetaan. Tietyn geenipaneelin sekvensoinnissa datan määrä on maltillisempi kuin WES:n kohdalla, joten se vaatii vähemmän esimerkiksi säilytyksen suhteen. Toisaalta, jos tunnetuista geeneistä ei löydy tautia aiheuttavaa mutaatioita, ei voida tutkia muita vaihtoehtoja, kuten WES:ssä. On toki mahdollista, että tunnetusta geenistä ei tiedetäkään vielä kaikkia eksoneita. Lisäksi kopionumerovaihteluiden (CNV), translokaatioiden ja inversioiden, sekä suurempien insertioiden ja deleetioiden havaitseminen on hyvin puutteellista tällä menetelmällä (Bamshad et al. 2011, Goh, Choi 2012).

Pseudogeinit ja muut homologiset alueet aiheuttavat joskus rinnastumisen väärään kohtaan genomia. Osalla alueista lukupeitto (eli se kuinka moneen kertaan sama DNA-fragmentti on sekvensoitu) saattaa olla heikko. Tällöin on riskinä saada väärä negatiivinen tulos, koska huonosti peitetyt alueet jätetään usein jatko-analyysin ulkopuolelle. Usein huonosti peitetyillä alueilla GC-prosentti on keskimääräistä suurempi. Huonosti peitetyt tai puuttuvat alueet voidaan joutua uudelleensekvensoimaan, esimerkiksi diagnostisessa tarkoituksessa, ja siitä aiheutuu lisäkustannuksia. Toisaalta tekniset artefaktat, jossa monella potilaalla on sama variantti, ovat suhteellisen tavallisia ja niiden tuloksena on vääriä positiivisia (Sulonen et al. 2011, Sikkema-Raddatz et al. 2013, Goh, Choi 2012).

Varianttien analysoinnissa on mahdollista ohittaa joku todellinen tautimutaatio, joten käytetyt kriteerit (esim. frekvenssien raja-arvot tietokannoissa) on syytä miettiä huolella. Yleensä löydetty tautimutaatiot uudelleensekvensoidaan Sanger-sekvensoinnilla niiden varmistamiseksi, mikä aiheuttaa lisäkustannuksia (Bamshad et al. 2011).

#### 2.6.5 Kohdennettu NGS diagnostiikan apuvälineenä

Kohdennettua uuden sukupolven sekvensointimenetelmää on diagnostisena apuvälineenä käytetty menestyksellisesti esimerkiksi kardiomyopatian (Sikkema-Raddatz et al. 2013) ja epileptisten oireyhtymien diagnosointiin (Lemke et al. 2012). Menetelmää on käytetty hyvin tuloksin myös CMT-potilailla (Ylikallio et al. 2014, Hoyer et al. 2014) ja HSP-potilaille, joilta ei ollut löydetty mutaatioita yleisestä *SPAST*-geenistä (Kumar et al. 2013).

Jos varianteista löytyy tunnettu tautimutaatio, joka vahvistetaan Sanger-sekvensoinnilla, geneettinen diagnoosi on saavutettu. Jos tunnetusta tautia aiheuttavasta geenistä löytyy tuntematon mutaatio, tarvitaan lisävarmistusta. Mikäli mahdollista, sekvensoidaan sukulaisten näytteet eli tutkitaan, segregoituuko variantti fenotyypin kanssa. Sukulaishäytteiden puuttuessa variantin patogeenisuutta täytyy arvioida muuten. Esimerkiksi jos muuttunut aminohappo on hyvin konservoitunut, on todennäköistä että se vaikuttaa proteiinin toimintaan tai rakenteeseen. Voidaan arvioida, kuinka merkittävästi aminohapon muutos vaikuttaisi proteiinin rakenteeseen tai tuotetaanko toimivaa proteiinia ollenkaan, jos mutaatio aiheuttaa ennenaikaisen STOP-kodonin. Lisäksi voidaan pohtia, vastaako uusi mutaatio ennestään tunnettuja mutaatioita tyypiltään ja potilaan fenotyyppi aikaisempien potilaiden fenotyyppejä. Usein asian varmistamiseksi funktionaaliset tutkimukset eivät ole tarpeellisia, mutta monissa tapauksissa lopullista varmistusta ei saada kuin tutkimalla mutaation vaikutuksia esimerkiksi solukokeilla.

### **3. Tavoitteet**

Tämän tutkimuksen tavoitteina oli löytää sairauden aiheuttanut tautimutaatio 28 CMT2-potilaalta ja 20 HSP-potilaalta käyttämällä kohdennettua uuden sukupolven sekvensointimenetelmää.

Tavoitteena oli myös kehittää kohdennetun uuden sukupolven sekvensointimenetelmän tulosten analysointia ja tutkia uuden sukupolven sekvensointimenetelmän soveltuvuutta sekä geenipaneelin toimivuutta CMT2- ja HSP-potilaiden geenidiagnostiikassa.

Tavoitteena oli myös tehdä funktionaalisia jatkotutkimuksia löydetyille mutaatioille niiden patogeenisuuden varmistamiseksi ja vaikutusten tutkimiseksi.

## 4. Materiaalit ja menetelmät

Tässä kappaleessa kerron tutkimukseen osallistuneista potilaista, käytetystä sekvensointimenetelmästä, varianttien analysoimisesta ja Sanger-sekvensoinnista sekä HSPB1-proteiinin tutkimisesta potilaan fibroblastisoluista Western blot-menetelmällä.

### 4.1 Potilaat

Tutkimuksessa oli mukana 28 CMT2-potilasta ja 20 HSP-potilasta (lyhenteet HP16-63). Joidenkin potilaiden sukulaisista oli myös saatu DNA-näytteitä mahdollisten tautimutaatioiden segregaatian tutkimista varten. Potilaiden näytteet saatiin Helsingin ja Oulun yliopistollisista sairaaloista. Potilaat antoivat suostumuksen tähän tutkimukseen. Tutkimukselle on HUS Medisiinisen eettisen toimikunnan puolto nro 371/13/03/01/12.

#### 4.1.1 CMT-potilaat

Yhteenveto CMT-potilaista on esitelty taulukossa 3. Tutkimuksessa oli mukana 28 CMT-potilasta. Yhdellä potilaalla oli CMT3, joka on vaikeampi CMT:n muoto ja alkaa usein jo lapsuudessa. Muilla potilailla oli CMT2. Potilaita oli kumpaakin sukupuolta: 14 naispuolista ja 14 miespuolista. Potilaat olivat eri-ikäisiä: suurin osa oli aikuisia, mutta myös muutama lapsipotilas oli mukana. Potilaiden iät olivat 3-84 vuotta. Suurimmalla osalla periytymismalliksi oli oletettu autosomaalisesti dominoiva periytyminen, neljällä potilaista periytyminen oli autosomaalisesti resessiivinen. Tiettävästi kahdeksalla potilaalla sairaus oli sporadinen.

Potilaiden fenotyypit erosivat toisistaan jonkin verran, sillä osalla oireet olivat motorispainotteisia ja osalla sensorispainotteisia. HP16-potilaalla oli aksonaalisen neuropatian lisäksi optinen atrofia. HP26-potilaalla oli Klinefelterin oireyhtymä, eli ylimääräinen X-kromosomi. Myös sairauden vaikeusasteissa oli eroa potilaiden välillä. Osalta potilaista oli ennen tutkimukseen osallistumista sekvensoitu *GDAP1*-mutaatio p.H123R. Osalta potilaista oli myös sekvensoitu *MFN2*-geeni ennen tätä tutkimusta. Kolme lapsipotilasta, joilla on todennäköisesti autosomaalisesti resessiivisesti periytyvä sairaus, oli aikaisemmin osallistunut eksomisekvensointitutkimukseen, mutta sairauden aiheuttavaa mutaatiota ei ollut löydetty. Heidät otettiin tähän tutkimukseen mukaan, jos joku CMT2-geeni olisi ollut WES-tutkimuksessa huonosti peitetty.

**Taulukko 3: Tutkimukseen osallistuneet 28 CMT-potilasta. Sukupuoli: N = naispuolinen, M = miespuolinen. Muuta-sarakkeessa muut mahdolliset sairaudet ja oireet sekä jos sairaus oli sporadinen.**

| Potilas | Diagnoosi | Sukupuoli | Syntymävuosi | Periytyminen | Muuta                                |
|---------|-----------|-----------|--------------|--------------|--------------------------------------|
| HP16    | CMT2      | N         | 2007         | AR           | Optinen atrofia, WES tehty           |
| HP17    | CMT2      | M         | 1998         | AR           | WES tehty                            |
| HP18    | CMT2      | M         | ?            | AR           | WES tehty                            |
| HP19    | CMT2      | N         | 1948         | AD           | Sporadinen                           |
| HP20    | CMT2      | M         | 1950         | AD           | Sporadinen                           |
| HP21    | CMT2      | N         | 1969         | AD           | Sporadinen                           |
| HP22    | CMT2      | M         | 1992         | AR           | Vaikea taudinkuva                    |
| HP23    | CMT2      | M         | 1957         | AD           |                                      |
| HP24    | CMT2      | N         | 1955         | AD           | Sporadinen                           |
| HP25    | CMT2      | N         | 1969         | AD           | Sporadinen                           |
| HP26    | CMT2      | M         | 1955         | AD           | Klinefelterin oireyhtymä, sporadinen |
| HP27    | CMT2      | N         | 1957         | AD           | sporadinen                           |
| HP28    | CMT2      | M         | 1974         | AD           |                                      |
| HP29    | CMT2      | M         | 1965         | AD           |                                      |
| HP30    | CMT2      | N         | 1949         | AD           |                                      |
| HP31    | CMT2      | M         | 1955         | AD           | Sporadinen                           |
| HP32    | CMT2      | N         | 1955         | AD           |                                      |
| HP33    | CMT2      | M         | 1995         | AD           |                                      |
| HP34    | CMT2      | N         | 1956         | AD           |                                      |
| HP36    | CMT2      | N         | 1948         | ?            |                                      |
| HP41    | CMT2      | M         | 1961         | AD           |                                      |
| HP43    | CMT2      | N         | 2000         | ?            |                                      |
| HP44    | CMT3      | M         | 2011         | ?            |                                      |
| HP56    | CMT2      | M         | 1932         | AD           |                                      |
| HP57    | CMT2      | N         | 1930         | AD           |                                      |
| HP58    | CMT2      | M         | 1944         | AD           |                                      |
| HP59    | CMT2      | N         | 1947         | AD           |                                      |

#### 4.1.2 HSP-potilaat

Yhteenveto HSP-potilaista löytyy taulukosta 4. HSP-potilaita oli tutkimuksessa mukana 20. Myös HSP-potilaita oli kumpaakin sukupuolta: 7 naispuolista ja 13 miespuolista. Potilaiden iät olivat 4-84 vuotta, lapsipotilaita oli kuusi. Useista potilaista ei tiedetty tarkemmin, periytyikö sairaus resessiivisesti vai dominoivasti. Ainakin yksi potilas oli varmuudella sporadinen tapaus.

**Taulukko 4: Tutkimukseen osallistuneet 20 HSP-potilasta. Sukupuoli: N = naispuolinen, M = miespuolinen. Muuta-sarakkeessa kerrottu mahdolliset muut oireet tai jos sairaus oli sporadinen.**

| Potilas | Diagnoosi | Sukupuoli | Syntymävuosi | Periytyminen | Muuta                     |
|---------|-----------|-----------|--------------|--------------|---------------------------|
| HP35    | HSP       | N         | 1993         | ?            | ALS2 tai HSP              |
| HP37    | HSP       | M         | 1962         | ?            | Pikkuaivo-atrofia         |
| HP38    | HSP       | N         | 2010         | ?            |                           |
| HP39    | HSP       | M         | 1957         | AD           |                           |
| HP40    | HSP       | M         | 1973         | AD           |                           |
| HP42    | HSP       | M         | 1970         | ?            |                           |
| HP45    | HSP       | M         | 1959         | AD           | Sporadinen                |
| HP46    | HSP       | M         | 1938         | AD           |                           |
| HP47    | HSP       | N         | 2003         | ?            | Vaikea monioireinen muoto |
| HP48    | HSP       | M         | 1995         | AD           |                           |
| HP49    | HSP       | N         | 2001         | ?            | Epilepsia                 |
| HP50    | HSP       | M         | 2000         | AD           |                           |
| HP51    | HSP       | N         | 1989         | AD           | Kehitysvamma, sporadinen  |
| HP52    | HSP       | M         | 1953         | AD           |                           |
| HP54    | HSP       | M         | 2000         | AR           |                           |
| HP55    | HSP       | M         | 2001         | AD           |                           |
| HP60    | HSP       | M         | 1956         | AD           |                           |
| HP61    | HSP       | N         | 1969         | ?            |                           |
| HP62    | HSP       | N         | 1950         | ?            | HSP tai PLS               |
| HP63    | HSP       | M         | 1951         | ?            | HSP tai PLS               |

Osalla potilaista oli monioireiseen muotoon viittaavia oireita. HP37-potilaalla oli pikkuaivo-atrofia ja myös HP47-potilaalla monioireiseen muotoon viittaavia oireita. HP49-potilaalla oli epilepsia ja

HP51-potilaalla kehitysvamma. Kolmella potilaalla HSP-diagnoosi ei ollut täysin varma: HP35:llä oireet sopivat myös ALS:iin (amyotrofinen lateraaliskleroosi) ja HP62:lla sekä HP63:lla oireet sopivat myös PLS:ään (primaarinen lateraaliskleroosi). Suurimmasta osasta potilaita ei ollut tarkempia tietoja oireista tai siitä, oliko sairaus yksi- tai monioireinen.

## **4.2 Kohdennettu uuden sukupolven sekvensointimenetelmä**

### **4.2.1 Sekvensointi**

Sekvensoinnin kohteelle, eli geenipaneelin geenien kaikille eksoneille, suunniteltiin koettimet SureDesign-ohjelmalla (Agilent Technologies). Geenipaneelissa oli 168 geeniä. Geenipaneelin suunnittelun teki Henna Tyynismaan tutkimusryhmä.

Kohteen rikastamisen ja monistamisen teki FIMM (Finnish Institute for Molecular Medicine). Siihen käytettiin HaloPlex Target Enrichment – kittiä (Agilent Technologies), jota käytettiin valmistajan ohjeiden mukaisesti. Potilaiden genominen DNA digestoitiin aluksi restriktioentsyymeillä, joita oli 16 kpl. Näin saatiin genomisesta DNA:sta koostuvien restriktiofragmenttien kirjasto. Seuraavaksi digestoitu DNA hybridisoitiin biotinyloituun HaloPlex-koetinkirjastoon (HaloPlex probe capture library). Koettimet hybridisoituivat genomisiin kohde-alueisiinsa. Hybridisaatiossa kohde-fragmentteihin lisättiin myös indeksisekvenssit. Koettimet ja kohde-alueen DNA-fragmentit sirkularisoituivat hybridisoituessaan ja streptavidinipäällysteiset helmet kiinnittyivät niihin. Sirkulaariset koetin-DNA-hybridit ligoitiin mahdollisten aukkojen varalta DNA-ligaasilla ja eluoitiin. Viimeisenä ne monistettiin PCR:llä ja puhdistettiin.

Sekvensoinnin teki FIMM MiSeq-sekvensoijalla (Illumina). FIMM teki myös alustavan analysoinnin sekvensointituloksille, jossa sekvensoinnin laatu tarkistetaan, sekvenssit rinnastetaan referenssisekvenssiin ja referenssistä poikkeavat variantit etsitään sekä annotoidaan (Variant calling pipeline) (Sulonen et al. 2011). Alustavan analysoinnin tulokset saatiin ja jatkoanalysointi tehtiin Henna Tyynismaan tutkimusryhmässä.



## 4.2.2 Geenipaneeli

**Taulukko 5: NGS-sekvensoinnin geenipaneelissa olleet geenit: Neuropatioihin, spastiseen paraplegiaan ja ALS-tautiin liittyvät geenit, aminoasyyli-tRNA-syntetaasit, mitokondriodynamiikkaan liittyvät geenit sekä muita kiinnostavina pidettyjä geenejä. Osa geenipaneelin geeneistä liittyy useampaan sairauteen, mutta ne on mainittu taulukossa vain yhdessä sarakkeessa.**

| Neuropatia |         | Paraplegia | ALS     | Aminoasyyli-tRNA-Syntetaasit | Mitokondriot | Muut     |
|------------|---------|------------|---------|------------------------------|--------------|----------|
| AARS       | LMNA    | ACP33      | ANG     | AARSD1                       | C10orf2      | CDC42BPG |
| ABHD12     | LRSAM1  | AFG3L2     | ATXN2   | CARS                         | DGUOK        | DHH      |
| ARHGEF10   | MED25   | ALS2       | C9orf72 | DARS                         | DNM1L        | EIF4G2   |
| ARSA       | MFN2    | AP4B1      | CHMP2B  | DARS2                        | FIS1         | HOXD10   |
| ASAH1      | MPZ     | AP5Z1      | FUS     | EPRS                         | MFF          | IKBKAP   |
| ATP7A      | MTMR2   | ATL1       | MAPT    | FARSA                        | MFN1         | NINJ1    |
| BSCL2      | NDRG1   | CYP7B1     | NEFH    | FARSB                        | MPV17        | SCN9A    |
| CCT5       | NEFL    | DDHD2      | OPTN    | IARS                         | MTFP1        | SIDT2    |
| CTDP1      | NGFB    | ERLIN2     | PFN1    | LARS                         | OPA1         | SIPA1L2  |
| DCTN1      | NTRK1   | FA2H       | PRPH    | MARS                         | PHB          | TEKT3    |
| DNM2       | PEX1    | GJC2       | PSEN1   | NARS                         | PHB2         | UNC80    |
| DYNC1H1    | PEX7    | GPA2       | SIGMAR1 | QARS                         | POLG         |          |
| EGR2       | PLEKHG5 | HSPD1      | TARDBP  | RARS                         | POLG2        |          |
| FAM134B    | PMM2    | KIAA0196   | TRPM7   | SARS                         | RRM2B        |          |
| FBLN5      | PMP22   | KIF1A      | UBQLN2  | TARS                         | SH3GLB1      |          |
| FGD4       | PRPS1   | KIF5A      | VAPB    | VARS                         | SMCR7        |          |
| FIG4       | PRX     | L1CAM      |         | WARS                         | SMCR7L       |          |
| GALC       | RAB7A   | NIPA1      |         |                              | SUCLA2       |          |
| GAN        | SBF2    | PGN        |         |                              | SUCLG1       |          |
| GARS       | SEPT9   | PLP1       |         |                              | TK2          |          |
| GDAP1      | SETX    | PNPLA6     |         |                              | TSFM         |          |
| GJB1       | SH3TC2  | REEP1      |         |                              | TYMP         |          |
| GJB3       | SLC12A6 | RTN2       |         |                              |              |          |
| HARS       | SOD1    | SPAST      |         |                              |              |          |
| HINT1      | SOX10   | SPG11      |         |                              |              |          |
| HK1        | SPTLC1  | SPG20      |         |                              |              |          |
| HSPB1      | SPTLC2  | SPG7       |         |                              |              |          |
| HSPB3      | TDP1    | TECPR2     |         |                              |              |          |
| HSPB8      | TRIM2   | VAMP1      |         |                              |              |          |
| IFRD1      | TRPV4   | VCP        |         |                              |              |          |
| IGHMBP2    | TTR     | VPS37A     |         |                              |              |          |
| INF2       | TUBB3   | ZFYVE26    |         |                              |              |          |
| KARS       | WNK1    | ZFYVE27    |         |                              |              |          |
| KIF1B      | YARS    |            |         |                              |              |          |
| LITAF      |         |            |         |                              |              |          |

Kaikki geenipaneelissa olleet geenit ovat taulukossa 5. Geenipaneelissa oli mukana 69 neuropatiaan liittyvää geeniä, 33 paraplegiaan liittyvää geeniä sekä 66 muuta mahdollista kandidaattigeeniä. Muut geenit olivat mukana siksi, että mukaan mahtui tietty määrä sekvensoitavaa ja tilaa jäi neuropatia- ja paraplegiageenien jälkeen. Mukana olivat siis kaikki suunnitteluhetkellä tunnetut neuropatioihin ja paraplegiaan liittyvät geenit. Lisäksi mukana oli ALS:iin liittyviä geenejä, koska yhden potilaan oireet voisivat viitata myös ALS:iin. Mukana olivat myös kaikki aminoasyyli-tRNA-syntetaasi-geenit, koska esimerkiksi *GARS* aiheuttaa CMT2:ta ja on mahdollista, että muitakin ARS-geenejä liittyisi CMT:hen (Antonellis, Green 2008). Lisäksi mukana oli geenejä, jotka liittyvät mitokondriodynamiikkaan ja mitokondriaalisen DNA:n ylläpitoon. Osa CMT:hen ja HSP:hen liittyvistä geeneistä vaikuttaa mitokondrioiden toimintaan ja on mahdollista että toistaiseksi tuntemattomista näihin sairauksiin liittyvistä geeneistä osa kuuluu tähän ryhmään. Mukana oli vielä joitakin geenejä, jotka olivat nousseet kiinnostavina esiin muissa yhteyksissä, kuten aikaisemmissa tutkimusryhmän eksomianalyyseissa, ja joita pidettiin mahdollisina uusina CMT:hen liittyvinä geeneinä.

#### 4.2.3 Ohjelmat ja tietokannat

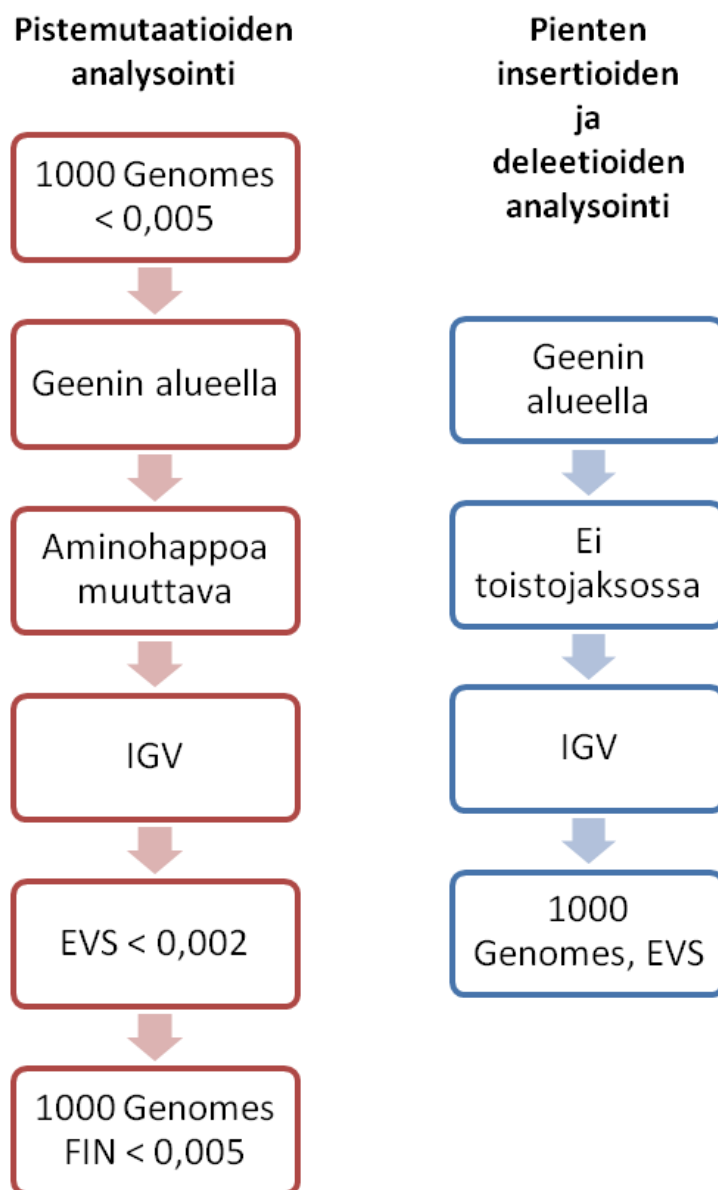
1000 Genomes-tietokanta (<http://browser.1000genomes.org/index.html>) sisältää noin 2500 eri ihmisen sekvensoitua genomia 25 eri populaatiosta eri puolilta maailmaa. Suomen populaatiosta sekvenssejä on noin sata. Exome Variant Server (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) on NHLBI Exome Sequencing Project (ESP) - projektin eksomitietokanta. Se sisältää 200 000 yhdysvaltalaisen ihmisen eksomisekvensointituloksen. Sisu, eli Sequencing Initiative Suomi (<http://sisu.fimm.fi/>) sisältää ainakin 3000 suomalaisen genomi- tai eksomisekvensointidataa (Lim et al. 2014).

Yllä mainituista tietokannoista saa yksittäisten varianttien frekvenssejä eli yleisyyksiä, 1000 Genomes-tietokannan osalta myös populaatiokohtaiset frekvenssit. Etsittäessä harvinaisia sairautta aiheuttavia mutaatioita, variantin yleisyys on tärkeä tieto. Suomalaisessa populaatiossa voi toisaalta olla variantteja, jotka ovat muualla maailmassa harvinaisia, mutta Suomessa paljon yleisempiä. Siksi on tärkeää saada tietoa myös potilaiden kanssa saman väestön frekvensseistä tietoa. 1000 Genomes-tietokannassa on mukana vain 100 suomalaista. Sisu-tietokannasta on merkittävästi hyötyä, koska siinä suomalaisten näytteiden määrä on huomattavasti edellistä suurempi. Tätä tutkimusta tehtäessä Sisu-tietokanta ei ollut vielä käytössä, mutta lopullisia variantteja tarkistettiin sieltä jälkeenpäin.

SIFT Genome Tool-ohjelma ([http://sift.jcvi.org/www/SIFT\\_chr\\_coords\\_submit.html](http://sift.jcvi.org/www/SIFT_chr_coords_submit.html)) ennustaa, vaikuttaako aminohapon muutos proteiinin toimintaan. Ennuste perustuu suuresti aminohapon kon-

servoitumiseen. SIFT myös muuttaa nukleotiditason mutaation aminohappotasolle, mihin tarkoitukseen sitä erityisesti käytettiin tässä tutkimuksessa. Sekvenssien tarkasteluun käytettiin Integrative Genomics Viewer-ohjelmaa (IGV, <https://www.broadinstitute.org/igv/>). Aminohappojen konservoitumisen tutkimiseen käytettiin: UCSB Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>) ja NCBI:n Homologene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene/>).

#### 4.2.4 Varianttien analysointi



Kuva 1: Pistemutaatioiden ja pienten insertioiden ja deleetioiden (indel) analysoiminen vuokaaviona.

#### 4.2.5 Pistemutaatiot

Varianttien analysoinnissa käytettiin Microsoft Excel 2013-ohjelmaa. FIMM:ltä saaduissa tuloksissa oli valmiina mukana 1000 Genomes-tietokannan frekvenssit löydetyille varianteille. Pistemutaatioiden analysointi on lyhyesti esitelty kuvan 1 vasemmalla puolella. Ensin suodatettiin pois variantit, joiden 1000 Genomes-frekvenssi oli yli 0,005. Raja on korkeahko dominoiville mutaatioille, mutta osalla potilaista sairaus periytyi resessiivisesti ja monella potilaalla periytymistapaa ei tiedetty. Dominoivan periytymisen osalta CMT:tä tai HSP:tä aiheuttavaa mutaatiota ei tulisi löytyä tietokannoista kuin korkeintaan hyvin pienellä frekvenssillä. Syynä on se, että kummatkin sairaudet ovat hyvin heterogeenisiä ja lisäksi tautia aiheuttaneet mutaatiot ovat usein olleet perhekohtaisia. Koska potilaissa oli sekä resessiivisesti että dominoivasti periytyviä tapauksia, kaikkien potilaiden kohdalla pidettiin kummatkin varianttityypit mukana. Lisäksi suodatettiin pois variantit, jotka olivat eksonien ulkopuolisella alueella.

Seuraavaksi jäljelle jääneet variantit syötettiin SIFT Genome Tool-ohjelmaan. Koska SIFT Genome Tool käsittelee vain koodaavia alueita, niiden ulkopuoliset variantit jäävät tässä vaiheessa pois. SIFT Genome Tool kertoo myös variantin aminohappoposition ja mahdollisen aminohapon muutoksen. Seuraavaksi suodatettiin pois synonyymiset (synonymous) variantit, eli sellaiset variantit, joissa aminohappo ei muutu. Seuraavaksi variantit tutkittiin Integrative Genome Viewer-ohjelmalla (IGV). Osa varianteista karsiutui pois, koska ne olivat esimerkiksi rinnastusvirheitä, selvästi intronialueella tai muuten geenipaneeliin kuulumattoman geenin alueella. Seuraavaksi karsittiin pois variantit, joilla oli 1000 Genomes-tietokannan Suomen populaation frekvenssi yli 0,005 ja ne, joilla oli EVS-tietokannassa frekvenssi yli 0,002. EVS-tietokannan kohdalla raja oli matalampi, koska tietokannassa on huomattavasti enemmän sekvenssejä kuin 1000 Genomes-tietokannassa.

Jäljelle jääneistä varianteista tutkittiin tarkemmin kyseisen geenin tunnettuja mutaatioita ja niihin liitettyjä fenotyyppejä käyttämällä esimerkiksi Online Mendelian Inheritance in Man-tietokantaa (OMIM, <http://omim.org/>). Jos geeniin yhdistetyt sairaudet olivat selvästi erilaisia kuin CMT tai HSP tai jos heterotsygootin variantin tapauksessa geenin aiemmin tunnetut mutaatiot olivat kaikki resessiivisiä, varianttia ei pidetty todennäköisenä tautimutaationa. Toisaalta, jos geeniin yhdistetty sairaus oli neurologinen, esimerkiksi joku muu neuropatia kuin CMT, pidettiin variantti mukana. Kaikkien potilaiden variantteja verrattiin myös toisiinsa. Jos sama variantti löytyi potilailta, joilla oli hyvin erilainen taudinkuva, varianttia ei pidetty todennäköisenä tautimutaationa.

Varianttia pidettiin mahdollisena tautia aiheuttavana mutaationa, jos geeniin liitetty sairaus ja periytymismalli sopivat yhteen potilaan fenotyypin ja variantin kanssa. Jos sukulaisnäytteitä oli saatavil-

la, tutkittiin, segregoituuko mutaatio fenotyypin kanssa. Tutkimuksen jo loputtua tuli käyttöön Sisutietokanta, josta vielä tarkistettiin lopullisten varianttien frekvenssit, ja tuloksia on käytetty tähän yhteenvedoon. Kaikkien mahdollisten tautia aiheuttavien mutaatioiden todenmukaisuus tarkistettiin Sanger-sekvensoinnilla.

#### **4.2.6 Pienet insertiot ja deletiot**

Pienet insertiot ja deletiot (indelit) analysoitiin osittain eri tavalla, mutta niidenkin kanssa käytettiin Microsoft Exceliä. Indelien analysointi on esitelty lyhyesti kuvan 1 oikealla puolella. Eksonien ulkopuoliset alueet ja kaikki toistojaksot suodatettiin pois. Jäljelle jäi suhteellisen vähän variantteja ja ne tutkittiin läpi IGV:llä. IGV:n avulla indeleistä karsiutui pois linjausvirheitä tai geenin ulkopuolella sijaitsevia indelejä. Jäljelle jääneitä indelejä verrattiin potilaiden kesken. Niistä suljettiin pois sellaiset variantit, joita oli potilailla, joiden taudinkuva oli hyvin erilainen. Indelejä etsittiin vielä 1000 Genomes- ja EVS-tietokannoista ja karsittiin pois yleiset indelit. Lopuksi tutkittiin geeniin liitettyjä sairauksia esimerkiksi OMIM-tietokannasta ja verrattiin, oliko potilaan sairaus samankaltainen, kuten pistemutaatioidenkin kanssa.

### **4.3 Varianttien Sanger-sekvensointi**

Kaikkien mahdollisina tautimutaatioina pidettyjen varianttien todenperäisyys varmistettiin Sanger-sekvensoinnilla. Myös potilaiden sukulaiset sekvensointiin kyseisten varianttien suhteen, jos sukulaisen DNA-näyte oli saatavilla.

#### **4.3.1 PCR-alukkeiden suunnittelu**

Halutut sekvenssit haettiin UCSC Genome Browserin (<http://genome.ucsc.edu/>) avulla, josta saatiin genomisen sekvenssi ja haluttu eksoni. Alukkeiden suunnittelussa käytettiin Primer 3 (v. 0.4.0)-ohjelmaa (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Ohjelmaan syötettiin haluttu eksoni sekä sen kummallekin puolelle hiukan intronista aluetta ja haluttu alukkeen koko.

### 4.3.2 PCR-ohjelmat

Sanger-sekvensoinnissa käytetyt alukkeet ovat taulukossa 6.

**Taulukko 6: Sekvensoitujen varianttien Sanger-sekvensoinnissa käytetyt alukkeet.** Taulukossa on kerrottu, mitä entsyymiä PCR:ssä käytettiin sekä alukkeen liittymisvaiheen (annealing) lämpötila (°C). Taulukossa on myös mainittu, jos PCR-ohjelma poikkesi tekstissä mainitusta. Alukkeen nimen F viittaa forward-suunnan alukkeeseen ja R reverse-suuntaan.

| Nimi            | Entsyymi                 | Lämpötila | 5' -> 3' sekvenssi         |
|-----------------|--------------------------|-----------|----------------------------|
| ATL1_ex_13_F    | Phusion                  | 54        | ACTCTGCATTGCATAAACAAA      |
| ATL1_ex_13_R    | Phusion                  | 54        | TTAGTTGTGAATTAAAGGTGTTCTT  |
| DNM1L_ex14_F    | Dynazyme                 | 57        | TTGGATAATCACTTTTGTTTTGC    |
| DNM1L_ex14_R    | Dynazyme                 | 57        | TGGAGTGTTAAAGGGAGGAAA      |
| DYNC1H1_ex26_F  | Dynazyme                 | 57        | GCTTGCTGAGTCTGTTACGG       |
| DYNC1H1_ex26_R  | Dynazyme                 | 57        | CCATCCACTGTTCTCCTTGA       |
| ARHGEF10_ex28_F | Dynazyme                 | 59,3      | TCTTGCTCATGTGGTTGAGG       |
| ARHGEF10_ex28_R | Dynazyme                 | 59,3      | GGATGTTAAATCACACTACACACTGC |
| GJB1_ex_2_F     | Dynazyme                 | 63        | CTTGCTTCATGGCTGGTGT        |
| GJB1_ex2_R      | Dynazyme                 | 63        | GCATAGCCAGGGTAGAGCAG       |
| HINT1_ex1_F     | Dynazyme                 | 69        | TGGAGCTCAAGACCAGGAAC       |
| HINT1_ex1_R     | Dynazyme                 | 69        | GACGATACCCACCTCAGCAG       |
| HSPB1_ex3_F     | Phusion                  | 59        | ACCCGGTGTGTAATGTAACG       |
| HSPB1_ex3_R     | Phusion                  | 59        | GCCTGAGGCTTCCTTCCAC        |
| KIAA0196_ex11_F | Dynazyme                 | 59        | TTCATAAGCTGCCTAGTCTGGA     |
| KIAA0196_ex11_R | Dynazyme                 | 59        | AACCTGTGCACACATTCCAA       |
| KIAA0196_ex14_F | Dynazyme,<br>40sykliä    | 59        | GCAGCCTGACATTTGCTGTA       |
| KIAA0196_ex14_R | Dynazyme,<br>40 sykliä   | 59        | GGATAAAATCCTGGGCTGAA       |
| KIAA0196_ex16_F | Phusion                  | 55,3      | CAGATGTTTCATTGCGTTTCC      |
| KIAA0196_ex16_R | Phusion                  | 55,3      | GGCCTGTGATATTTTCATGACTG    |
| KIF1A_ex4_F     | Dynazyme,<br>9+25 sykliä | 58        | CCTGCAACTTCATTCCTTCC       |

|                     |                          |    |                             |
|---------------------|--------------------------|----|-----------------------------|
| <b>KIF1A_ex4_R</b>  | Dynazyme,<br>9+25 sykliä | 58 | GCTCTCAGCCTCAGCTGGT         |
| <b>LRSAM1_ex8_F</b> | HotStart,<br>TOPO        | -  | TCCCAAAGTGCTGGGATTAC        |
| <b>LRSAM1_ex8_R</b> | HotStart,<br>TOPO        | -  | GATGGCCCAGAGCTGATG          |
| <b>POLG2_ex1_F</b>  | Dynazyme                 | 63 | AACGCAGACATGCGCTTC          |
| <b>POLG2_ex1_R</b>  | Dynazyme                 | 63 | ATCCCCAAGATCCAGCAAG         |
| <b>POLG2_ex3_F</b>  | Gold                     | 61 | CAGTCATTTCCTTGGGATAA        |
| <b>POLG2_ex3_R</b>  | Gold                     | 61 | TCAGAAGAATTACCACTGACACA     |
| <b>SPAST_ex2_F</b>  | Gold                     | 61 | TGTATTACCTCTCAACAGCATGA     |
| <b>SPAST_ex2_R</b>  | Gold                     | 61 | TGAAATCTGGACAATCATGTGAA     |
| <b>SPAST_ex15_F</b> | Dynazyme                 | 63 | GGAGGGGAAATAATTTGCTG        |
| <b>SPAST_ex15_R</b> | Dynazyme                 | 63 | TGGACTTCTTAACTTCTAAGGTGGT   |
| <b>TRPM7_ex26_F</b> | Phusion<br>(GC-buffer)   | 58 | TTTGAGGCTACAAAATAAAATTCTACA |
| <b>TRPM7_ex26_R</b> | Phusion<br>(GC-buffer)   | 58 | AAGTGGCTTTTGCAACTTGG        |

Dynazyme II – entsyymiä käytettiin seuraavien eksonien sekvensointiin: *POLG2* eksoni 1, *GJB1* eksoni 2, *ARHGEF10* eksoni 28, *DNM1L* eksoni 14, *HINT1* eksoni 1, *DYNC1H1* eksoni 26, *KIF1A* eksoni 4 sekä *SPAST* eksoni 15. Templaattina oli 1 µl (25ng/µl) potilaan genomista DNA:ta, 10x buffer for Dynazyme DNA Polymerase (Thermo Scientific) 2,5 µl, kumpaakin aluketta 0,5 µl (F, Forward- ja R, Reverse-alukkeet, Sigma), dNTP Mix (10 mM jokaisesta nukleotidia, Thermo Scientific) 1,0 µl, MgCl<sub>2</sub> 1,0 µl, H<sub>2</sub>O 18,2 µl ja Dynazyme II DNA Polymerase (2 U/µl, Thermo Scientific) 0,3 µl. PCR-ohjelma oli: 1.) 95 °C 4 min. 2.) 95 °C 1 min. 3.) 55–65 °C 1 min. 4.) 72 °C 1 min. 5.) 2.-4. vaiheet yhteensä 35 kertaa, jos ei ole toisin mainittu 6.) 72 °C 10 min.. Kohdan 3.) lämpötilat on kerrottu taulukossa 6, kuten myös se, jos syklejä oli eri määrä kuin yllä kuvatussa ohjelmassa.

*KIF1A* eksonin 4 PCR-ohjelma oli hiukan erilainen: Templaattina oli potilaan genomista DNA:ta (25 ng/µl) 1,0 µl, 10x Buffer for Dynazyme DNA Polymerase (Thermo Scientific) 2,5 µl, alukkeita 2,5 µl kumpaakin (F- ja R-alukkeet, Sigma), dNTP Mix (10 mM jokaista nukleotidia, Thermo

Scientific) 2,5 µl, H<sub>2</sub>O 14,35 µl ja Dynazyme II DNA Polymerase (2 U/µl, Thermo Scientific) 0,5 µl. PCR-ohjelma: 1.) 94 °C 2 min. 2.) 94 °C 1 min. 3.) 58 °C 1 min. 4.) 72 °C 2 min. 5.) vaiheet 2.-4. yhteensä 9 kertaa 6.) 94 °C 1 min. 7.) 58 °C 1 min. 8.) 72 °C 2 min. + 2 s./sykli 9.) vaiheet 6.-8. yhteensä 25 kertaa. 10.) 72 °C 10 min..

Phusion-entsyymiä käytettiin seuraavien eksonien sekvensoimiseen: *HSPB1* eksoni 3, *TRPM7* eksoni 26, *KIAA0196* eksoni 16 ja *ATL1* eksoni 13. Templaattina oli 1,5 µl genomista potilaan DNA:ta (25 ng/µl), 5x Phusion HF Reaction Buffer (Thermo Scientific) 4,0 µl, F- ja R-aluketta 1,0 µl kumpaakin (Sigma), dNTP Mix (10 mM jokaista nukleotidia, Thermo Scientific) 0,5 µl, DMSO (100 %, Thermo Scientific) 1,0 µl, H<sub>2</sub>O 15,8 µl ja Phusion DNA Polymerase (2 U/µl, Thermo Scientific) 0,2 µl. PCR-ohjelma: 1.) 98 °C 30 s. 2.) 98 °C 10 s. 3.) 55–65 °C 30 s. 4.) 72 °C 30 s. 5.) vaiheet 2.-4. yhteensä 35 kertaa 6.) 72 °C 10 min.. Kohdan 3.) lämpötilat on kerrottu taulukossa 6, *HSPB1* eksonin 3 sekvensoinnissa käytettiin puskurina 5x Phusion GC Reaction Buffer (Thermo Scientific, sama tilavuus).

Gold-entsyymiä käytettiin *POLG2* eksoni 3 ja *SPAST* eksoni 2 sekvensoimiseen: Potilaan genomista DNA:ta 2,0 µl (25 ng/µl), 10x PCR Gold buffer (Applied Biosystems) 1,0 µl, F- ja R-alukkeet 0,25 µl kumpaakin, dNTP Mix (10 mM jokaista nukleotidia, Thermo Scientific) 0,2 µl, MgCl<sub>2</sub> 0,8 µl, H<sub>2</sub>O 5,5 µl ja AmpliTaq Gold (5 U/µl, Applied Biosystems) 0,05 µl. PCR-ohjelma: 1.) 94 °C 10 min. 2.) 94 °C 30 s. 3.) 61 °C 30 s. 4.) 72 °C 1 min. 15 s. 5.) vaiheet 2.-4. 35 kertaa yhteensä 6.) 72 °C 10 min..

Kaikkien PCR-tuotteiden koko tarkistettiin ennen sekvensointireaktioita, ajamalla PCR-tuotetta 1 % agarosigeelille.

*LRSAMI* eksoni 8 PCR-reaktioon käytettiin KAPA 2G Robust HotStart ReadyMix (2X) (BioTop)-entsyymiä: Potilaan genomista DNA:ta (25 ng/µl) 3,0 µl, kumpaakin aluketta 1,25 µl (F- ja R- aluke, Sigma), DMSO 1,25 µl, H<sub>2</sub>O 5,7 µl ja HotStart ReadyMix (BioTop) 12,5 µl. PCR-ohjelma: 1.) 95 °C 3 min. 2.) 95 °C 15 s. 3.) 60 °C 15 s. 4.) 72 °C 15 s. 5.) vaiheet 2.-4. yhteensä 35 kertaa 6.) 72 °C 10 min.. PCR-tuote ajettiin 1 % agarosigeelille. Oikean kokoisen viivan kohdalta leikattiin geelistä pala irti ja se puhdistettiin NucleoSpin Gel and PCR Clean Up-kitillä (BioTop), kitin ohjeiden mukaan.

Sekvensoinnin hankaluuden vuoksi *LRSAMI* eksoni 8 kloonattiin TOPO-vektoriin, tarkoituksena sekvensoida se. Kaikki reagenssit olivat kitistä TOPO TA Cloning Kit for Sequencing PCR 4-TOPO Vector (Invitrogen), jos ei ole toisin mainittu. Transformaatiota varten tehtiin TOPO Cloning



Reaction (*LRSAMI* eksonin 8 insertio TOPO-vektoriin): PCR-tuotetta 4,0 µl, Salt Solution 1,0 µl, TOPO Vector 1,0 µl. Reaktio oli 30 min. huoneenlämmössä.

Transformaatio tehtiin kompetentteihin *E. coli*-soluihin. Transformaatioon tuli 50 µl *E. coli*-bakteereja ja 4 µl *LRSAMI*-TOPO-vektoria. Ensin reaktiota inkuboitiin jäällä 30 minuuttia, sitten tehtiin lämpöshokki +42 °C 30 sekuntia ja pidettiin uudestaan jäällä 2 minuuttia. Putkeen lisättiin 250 µl SOC-liuosta (HUSLab) ja se laitettiin +37 °C tunniksi ravisteluun. Sen jälkeen putki tyhjenettiin maljalle, levitettiin neste tasaisesti maljan pinnalle ja laitettiin malja +37 °C yön yli. Maljalla oli antibioottina ampisilliini (Amp). Maljalla oli useita pesäkkeitä, joista kymmenestä tehtiin jatkoviljely, 4 ml LB ja 2 µl ampisilliinia liuokseen. Putket laitettiin kasvamaan +37 °C.

Viljelyputkista eristettiin plasmidit NucleoSpin Plasmid-kitillä (BioTop) kitin ohjeiden mukaan. Alun sentrifugointi tehtiin: 2200 rpm, 10 min., +22 °C. Eristetyt plasmidit tarkistettiin testidigestiolla, käyttämällä *EcoRI*-restriktioentsyymiä: 17 µl plasmidia, 2 µl Fast Green Buffer (Thermo Scientific), 1 µl Fast *EcoRI* (Fermentas). Digestio tehtiin +37 °C 25 min. Digestion jälkeen koko tarkistettiin ajamalla 1 % agarosigeelille.

#### 4.3.3 Sekvensointi

PCR-tuotteet puhdistettiin ennen sekvensointia EXOSAP reaktiolla: PCR-tuotetta 5,0 µl, Exonuclease I 0,5 µl (20 U/µl, Thermo Scientific), FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase 1,0 µl (1 U/µl, Thermo Scientific). Inkubointi 37 °C 15 min. ja reaktion lopetus 85 °C 15 min..

Sekvensointireaktiot tehtiin BigDye v3.1 (Novagen) menetelmällä. F- ja R-alukkeille tehtiin omat reaktionsa. Puhdistettua PCR-tuotetta 2,0 µl, aluke 0,65 µl (Sigma, kummallekin alukkeelle oma reaktio), Dilution buffer v3.1 1,75 µl, H<sub>2</sub>O 5,1 µl ja BigDye RR mix v3.1 0,5 µl. PCR-ohjelma: 1.) 96 °C 1 min. 2.) 96 °C 10 s. 3.) 50 °C 5 s. 4.) 60 °C 4 min. 5.) vaiheet 2.-4. 25 kertaa yhteensä 5.) 10 °C.

*LRSAMI*-TOPO-vektorin sekvensointireaktio oli seuraavanlainen: BigDye v3.1: plasmidi-DNA:ta 0,5 µl, aluke 0,65 µl (kummallekin alukkeelle oma reaktio), Dilution buffer v3.1 1,5 µl (Novagen), H<sub>2</sub>O 6,35 µl ja BigDye RR mix v3.1 (Novagen) 1,0 µl. PCR-reaktio: 1.) 96 °C 1 min. 2.) 96 °C 10 s. 3.) 50 °C 5 s. 4.) 60 °C 4 min. 5.) vaiheet 2.-4. yhteensä 25 kertaa 6.) 10 °C.

Sekvensointireaktioiden ajon suoritti FIMM.

## 4.4 Proteiinieristys fibroblasteista ja HSPB1 Western blot

Proteiinieristys fibroblastisoluista ja HSPB1:n Western Blot pystytettiin ensin erään tähän tutkimukseen kuulumattoman CMT-potilaan fibroblasteilla. Tältä potilaalta oli löytynyt pistemutaatio c.380G>T (p.Arg127Leu) *HSPB1*-geenistä. Potilaan HP19 fibroblastinäyte ei saapunut ajoissa tätä tutkimusta varten, mutta niitä tutkittiin myöhemmin.

### 4.4.1 Fibroblastien kasvatus ja proteiinien eristys

CMT-potilaalta, jolla oli aiemmissa tutkimuksissa löydetty aminohappoa muuttava *HSPB1*-mutaatio, saatiin fibroblastiviljelmä. Lisäksi kontrolleina oli kolmen terveen ihmisen fibroblasteja. Fibroblasteja kasvatettiin lämpökaapissa 10 cm maljoilla DMEM-Media-elatusaineessa (Lonza). Solujen jakaminen tehtiin kun solut peittivät maljan: elatusaine poistettiin ja malja pestiin kahteen kertaan 1 x PBS:llä. Maljalle lisättiin 800–1000 µl 1 x trypsiini-EDTA:ta ja inkuboitiin +37 °C 2-3 minuuttia solujen irrottamiseksi. Tämän jälkeen solut suspensoitiin 10 ml elatusaineeseen ja jaettiin uusille maljoille.

Proteiinien keräämiseksi maljat pestiin jääkylmällä 1x PBS:llä kaksi kertaa. Sen jälkeen maljoille lisättiin maljaa kohden 500 µl RIPA-puskuria ja 1/2 inhibiittoritabletti (Pierce Protease Inhibitor Mini Tablets, Thermo Scientific). Solut raaputettiin maljan reunalle raaputtajalla ja siirrettiin siitä pipetillä PCR-putkeen. Solulysaattia pidettiin jäällä 20 min., jonka jälkeen se sentrifugoitiin 20 min. +4 °C, 20 000 g. Supernatantti otettiin talteen uuteen putkeen.

Proteiinikonsentraatiot mitattiin Bradford-menetelmällä ja SoftMax Pro:lla (Molecular Devices). Standardeina käytettiin BSA:ta (Bovine Serum Albumin Lyophilised pH 7, Biowest), 1mg/1ml, määrinä 0,5 – 5,0 µl. Standardeja oli tripleteinä 1 µl. Näytteet ja standardit pipetoitiin mikrotiitterilevylle ja kaikkien näytteiden päälle laitettiin 200 µl Bradfordia (1:4), kolmeen kuoppaan kerrallaan.

### 4.4.2 Western blot

5 x SDS-PAGE-latauspuskuri lisättiin potilaan ja kolmen kontrollin proteiininäytteisiin (proteiinia n. 20 µg). Proteiinit eroteltiin SDS-PAGE-geelissä. Geelinä oli Mini-Protean TGX Gels (BioRad) ja ajolaitteena Bio-Rad. Puskurina oli 1 x Running Buffer (0,3 % Tris (BioNordika), 1,44 % Glysiini

(Fisher Chemical), 0,06 % SDS (0,5g, Medicago)). Membraani (Transfer membranes, pore size 0,45  $\mu\text{m}$ , Filter type PVDF, Immobilon-P) käsiteltiin metanolilla.

Blottaus tehtiin laitteella Owl HEP-1 (Thermo Scientific). Geeli ja membraani laitettiin blottauslaitteeseen kahden Whatman-paperikerroksen väliin. Blottaus tehtiin 36 mA, 1h 10 min. Blottauksen jälkeen membraani blokattiin 5 % maito-TBST:ssä (5 % maitojauhe (Valio), 0,24 % Tris (BioNordika), 0,8 % NaCl (Fisher Scientific), 1 % Tween20 (Sigma)), noin tunti huoneenlämmössä. Membraani inkuboitiin tämän jälkeen primaarisessa vasta-aineessa, Anti-HSPB1 1:2500 (2  $\mu\text{l}$  anti-HSPB1 ja 5 ml 1 % BSA), yön yli kylmähuoneessa ravistelussa. Seuraavana päivänä membraani pestiin kolmeen kertaan 5 minuuttia 1 x TBST:ssä. Sekundaarisena vasta-aineena oli anti-rabbit (0,5  $\mu\text{l}$  a-rabbit ja 5 ml 1 x BSA) ja membraania inkuboitiin siinä tunti, jonka jälkeen se pestiin jälleen kolmeen kertaan 5 minuuttia 1 x TBST:ssä. Detektioon käytettiin Clarity Western ECL Substrate (luminal & peroxide solution, BioRad), valmistajan ohjeiden mukaan.

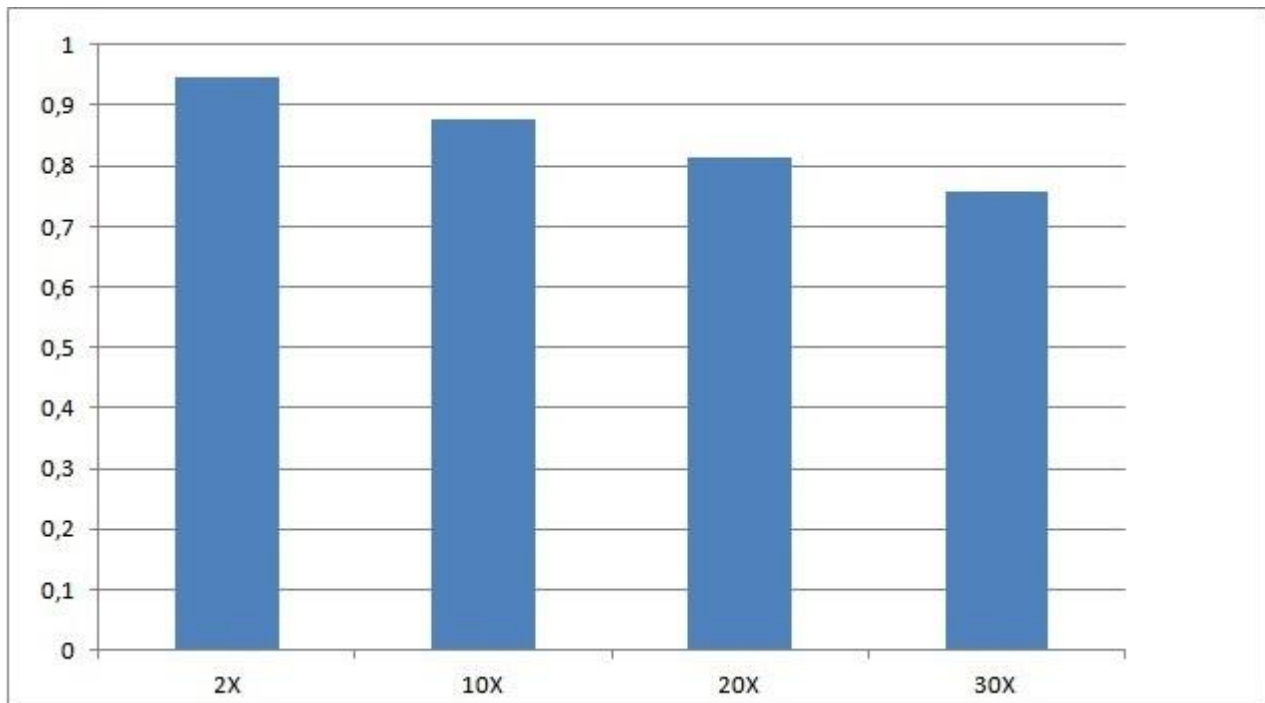
Latauskontrollia varten, membraanin kuvaamisen jälkeen, membraani käsiteltiin Stripping-puskurilla (0,78 %  $\beta$ -merkaptetaanoli, 4,2 % 1,5 M Tris pH 8,8, 10 % SDS (20 %)), lisättynä 195  $\mu\text{l}$   $\beta$ -merkaptetaanolilla (Bio-Rad), 50 °C vesihauteessa 30 min.. Tämän jälkeen membraani pestiin kolmeen kertaan 5 minuuttia TBST:ssä. Blokkauks tehtiin 5 % maitojauhe + TBST:llä, 45 min. heiluttajassa. Primaarisena vasta-aineena käytettiin nyt anti- $\beta$ -tubulin, 1:1000. Membraani laitettiin vasta-aineeseen yön yli, kylmähuoneeseen ja heilutukseen. Tämän jälkeen membraani käsiteltiin samoin kuin aiemman vasta-aineen kanssa, sekundaarinen vasta-aine oli sama. Signaali detektoitiin jälleen ECL-reaktiolla.

## 5. Tulokset

### 5.1 Kohdennetun sekvensoinnin onnistuminen

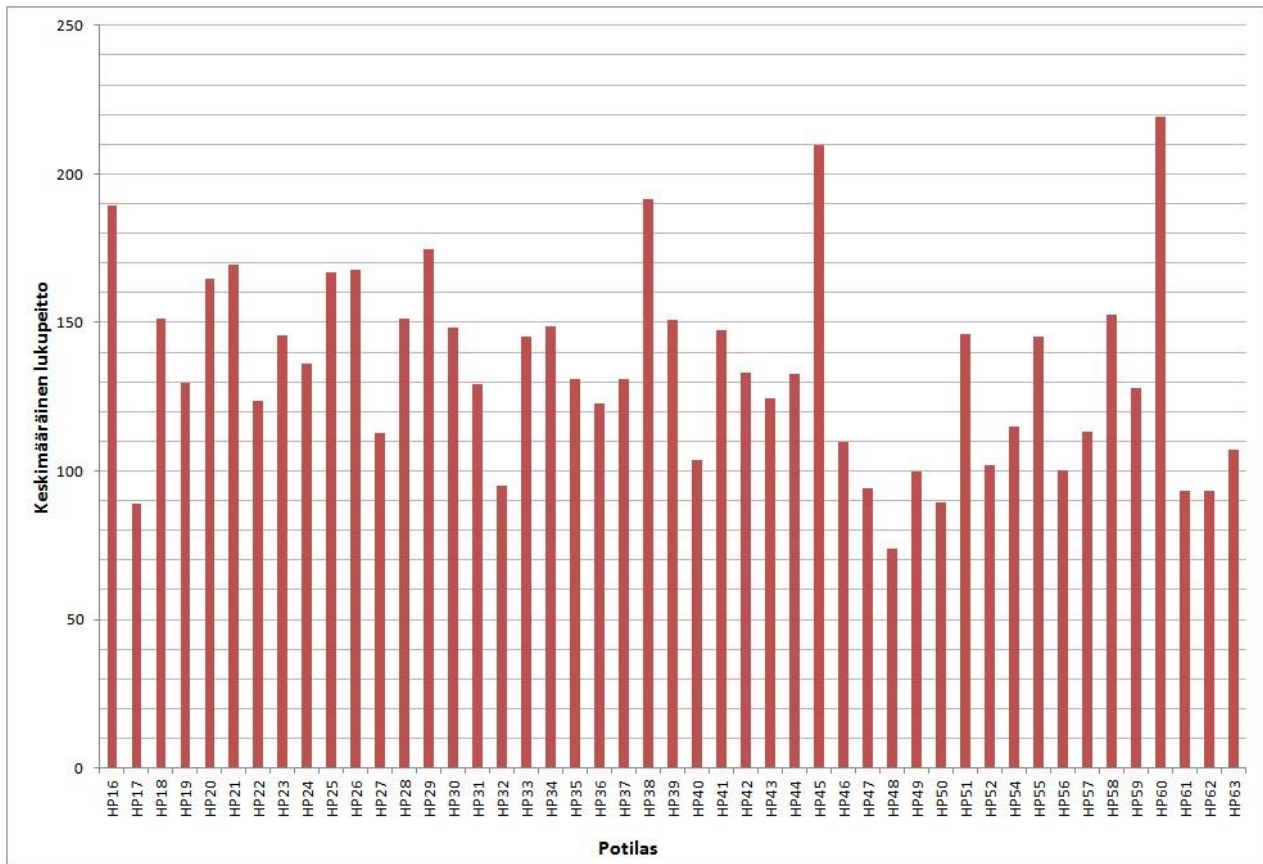
Keskimäärin kohde (eli kaikki geenipaneelin geenien eksonit) oli peitetty kymmeneen kertaan 87,6 % ja kahteenkymmeneen kertaan 81,2 %. Kuvassa 2 on kaikkien potilaiden keskimääräinen kohteen lukupeitto eri kertoimilla.

**Kuva 2: Keskimääräinen kohteen lukupeitto kaikkien potilaiden osalta: kuinka monta prosenttia kohteesta oli sekvensoitu kahteen, kymmeneen, kahteenkymmeneen ja kolmeenkymmeneen kertaan. 2X keskimäärin 94,78 %, 10x 87,63 %, 20x 81,27 % ja 30x 75,70 %.**

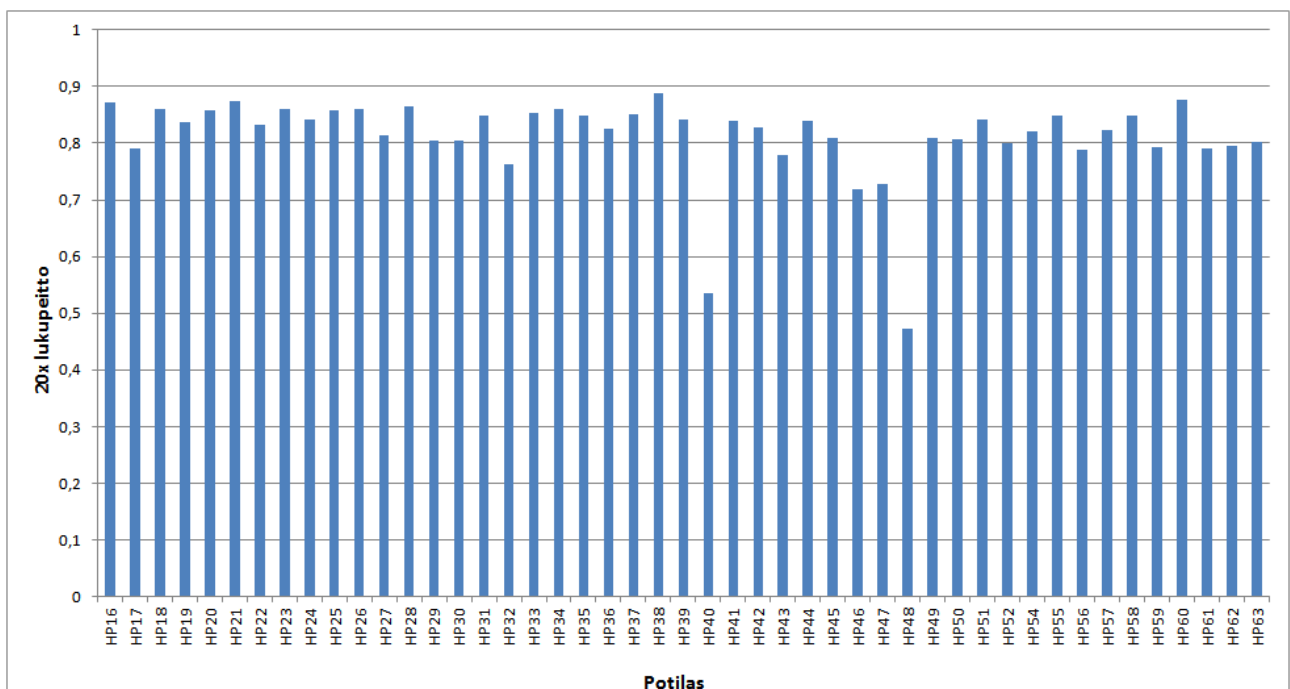


Kuvassa 3 on potilaskohtaiset keskimääräiset lukupeitot, eli kuinka monta kertaa keskimäärin emäs on sekvensoitu. Keskimäärin lukupeitto oli noin 134-kertainen (mediaani 131). Potilaskohtaisesti eroja oli kuitenkin jonkun verran. Pienin lukupeitto oli 73,7 (potilas HP48) ja suurin 219 (potilas HP45). Selvästi muita huonompia lukupeittoja (alle 90) oli potilailla HP17, HP48 ja HP50. Selvästi muita parempia lukupeittoja (yli 180) oli potilailla HP16, HP38, HP45 ja HP60.

**Kuva 3: Keskimääräinen lukupeitto (kuinka monta kertaa) potilaskohtaisesti. Keskiarvo 134, mediaani 131, keskihajonta 32,3. Suurin lukupeitto 219 ja pienin 74.**



**Kuva 4: Potilaskohtaisesti osuus kohteesta, joka on peitetty kahteenkymmeneen kertaan. Keskiarvo 81,3 %, mediaani 83,2 %. Suurin arvo 88,7 %, pienin arvo 47,3 %.**



Kuvassa 4 on potilaskohtaisesti niiden emästen osuus, jotka oli peitetty 20-kertaisesti. Keskimäärin 20 kertaa oli peitetty 81,3 % alueesta (mediaani 83 %). Suurin arvo oli 88,7 % (potilaalla HP38) ja pienin 47,3 % (potilaalla HP48). Selvästi huonommin oli peittynyt potilailla HP40 ja HP48.

## **5.2 Varianttien analysoinnin tulokset**

### **5.2.1 Varianttien analysointi**

Taulukossa 7 on kuvattu pistemutaatioiden määrät potilaskohtaisesti alussa, sekä jokaisen analysointivaiheen jälkeen, analysoinnin havainnollistamiseksi. Taulukossa 8 on vastaavasti indeliemäärät vaiheittain. Lopputulossarakkeiden variantit ovat niitä, joita pidettiin mahdollisesti patogeenisina ja ne Sanger-sekvensoitiin. Osa loppuvaiheen varianteista ei edennyt tähän vaiheeseen esimerkiksi siksi, että ne liittyivät erilaiseen fenotyyppiin kuin potilaalla oli.

Alussa pistemutaatioita oli keskimäärin noin 1380 ja 1000 genomes-frekvenssin avulla suodattamalla eksoneissa sijaitsevia variantteja jäljelle jäi keskimäärin 90. Näistä aminohappoa muuttavia variantteja oli keskimäärin enää 21 ja IGV:n avulla määrä tippui keskimäärin neljään. Edelleen EVS- ja 1000 Genomes-tietokannan Suomen populaation frekvenssien avulla suodattamalla jäljelle jäi keskimäärin noin kolme varianttia. Indeliemäärä kohdalla alussa oli keskimäärin 230 indeliä. Intronialueet ja toistojaksot pois suodattamalla jäljelle jäi keskimäärin vain 22 indeliä ja edelleen IGV:n avulla määrä tippui noin 7,5:een. HSP- ja CMT-potilaiden indelejä vertaamalla jäljelle jäi keskimäärin vähemmän kuin yksi indel.

Kaikkiaan 18 eri varianttia eri potilailla pidettiin mahdollisina tautia aiheuttavina mutaatioina ja ne Sanger-sekvensoitiin. Näistä indelejä oli vain kaksi ja muut olivat pistemutaatioita. Myös sukulaisten näytteet sekvensoitiin, jos niitä oli saatavilla. 30 potilaalle ei löytynyt lainkaan mahdollista tautia aiheuttavaa mutaatiota sekvensoitavaksi.

**Taulukko 7: Varianttien analysoiminen potilaskohtaisesti ja vaiheittain. Variantit: varianttien määrä alus-  
sa. Muu: muulla perusteella poissuljetut variantit, esim. väärään sairauteen liittyvät. Lopputulos: mah-  
dolliset patogeeniset mutaatiot, jotka Sanger-sekvensoitiin.**

| Potilas | Variantit | 1000<br>Genomes<br>< 0,005 | Geenin<br>alueella | Aminohappoa<br>muuttavat | IGV | EVS<br><0,002 | 1000<br>Genomes<br>FIN <<br>0,005 | Muu | Loppu-<br>tulos |
|---------|-----------|----------------------------|--------------------|--------------------------|-----|---------------|-----------------------------------|-----|-----------------|
| HP16    | 1417      | 371                        | 87                 | 20                       | 1   | 1             | 1                                 | 0   | 0               |
| HP17    | 1221      | 245                        | 84                 | 17                       | 2   | 1             | 1                                 | 1   | 1               |
| HP18    | 1474      | 358                        | 91                 | 25                       | 7   | 6             | 5                                 | 5   | 0               |
| HP19    | 1368      | 368                        | 101                | 26                       | 4   | 3             | 1                                 | 0   | 0               |
| HP20    | 1362      | 354                        | 83                 | 18                       | 1   | 0             | 0                                 | 0   | 0               |
| HP21    | 1418      | 376                        | 89                 | 24                       | 2   | 1             | 1                                 | 1   | 1               |
| HP22    | 1324      | 311                        | 83                 | 22                       | 1   | 1             | 0                                 | 0   | 0               |
| HP23    | 1454      | 352                        | 82                 | 24                       | 8   | 8             | 4                                 | 3   | 0               |
| HP24    | 1509      | 374                        | 110                | 29                       | 5   | 5             | 2                                 | 1   | 0               |
| HP25    | 1414      | 380                        | 95                 | 11                       | 0   | 0             | 0                                 | 0   | 0               |
| HP26    | 1388      | 369                        | 99                 | 24                       | 2   | 2             | 1                                 | 1   | 0               |
| HP27    | 1423      | 322                        | 102                | 28                       | 2   | 1             | 1                                 | 1   | 0               |
| HP28    | 1474      | 367                        | 75                 | 10                       | 7   | 3             | 2                                 | 1   | 1               |
| HP29    | 1368      | 327                        | 77                 | 12                       | 3   | 2             | 1                                 | 1   | 1               |
| HP30    | 1363      | 341                        | 83                 | 26                       | 4   | 4             | 4                                 | 2   | 1               |
| HP31    | 1322      | 328                        | 86                 | 16                       | 3   | 3             | 3                                 | 2   | 1               |
| HP32    | 1262      | 272                        | 65                 | 7                        | 4   | 4             | 3                                 | 2   | 1               |
| HP33    | 1409      | 385                        | 76                 | 14                       | 7   | 2             | 2                                 | 1   | 0               |
| HP34    | 1477      | 352                        | 90                 | 15                       | 2   | 0             | 0                                 | 0   | 0               |
| HP35    | 1456      | 352                        | 65                 | 11                       | 1   | 0             | 0                                 | 0   | 0               |
| HP36    | 1183      | 275                        | 70                 | 17                       | 4   | 3             | 3                                 | 2   | 1               |
| HP37    | 1419      | 353                        | 71                 | 21                       | 11  | 10            | 5                                 | 3   | 0               |
| HP38    | 1554      | 419                        | 71                 | 8                        | 3   | 1             | 1                                 | 0   | 0               |
| HP39    | 1514      | 369                        | 78                 | 13                       | 4   | 3             | 2                                 | 2   | 1               |
| HP40    | 1281      | 492                        | 175                | 57                       | 17  | 17            | 17                                | 14  | 1               |
| HP41    | 1477      | 413                        | 96                 | 13                       | 1   | 0             | 0                                 | 0   | 0               |
| HP42    | 1342      | 343                        | 96                 | 13                       | 2   | 1             | 1                                 | 1   | 0               |
| HP43    | 1382      | 378                        | 135                | 30                       | 2   | 2             | 0                                 | 0   | 0               |
| HP44    | 1404      | 373                        | 98                 | 23                       | 4   | 4             | 4                                 | 3   | 0               |
| HP45    | 1476      | 433                        | 84                 | 14                       | 4   | 4             | 4                                 | 3   | 0               |
| HP46    | 1368      | 344                        | 103                | 29                       | 4   | 4             | 4                                 | 3   | 0               |
| HP47    | 1288      | 330                        | 73                 | 25                       | 6   | 5             | 3                                 | 3   | 1               |
| HP48    | 1031      | 274                        | 78                 | 26                       | 9   | 8             | 7                                 | 4   | 0               |
| HP49    | 1340      | 347                        | 114                | 25                       | 6   | 4             | 4                                 | 4   | 0               |
| HP50    | 1352      | 249                        | 69                 | 10                       | 1   | 1             | 1                                 | 1   | 0               |
| HP51    | 1459      | 409                        | 105                | 24                       | 3   | 3             | 2                                 | 2   | 1               |
| HP52    | 1226      | 283                        | 73                 | 25                       | 3   | 3             | 1                                 | 1   | 0               |
| HP54    | 1433      | 370                        | 101                | 27                       | 6   | 5             | 4                                 | 1   | 0               |
| HP55    | 1388      | 392                        | 92                 | 26                       | 5   | 5             | 4                                 | 2   | 2               |
| HP56    | 1415      | 376                        | 105                | 24                       | 8   | 6             | 5                                 | 1   | 0               |
| HP57    | 1424      | 399                        | 98                 | 19                       | 5   | 3             | 3                                 | 1   | 0               |
| HP58    | 1553      | 446                        | 105                | 26                       | 6   | 6             | 6                                 | 2   | 0               |
| HP59    | 1432      | 430                        | 139                | 27                       | 4   | 4             | 4                                 | 1   | 0               |

|             |      |     |    |    |   |   |   |   |   |
|-------------|------|-----|----|----|---|---|---|---|---|
| <b>HP60</b> | 1431 | 402 | 83 | 18 | 9 | 9 | 7 | 3 | 1 |
| <b>HP61</b> | 1324 | 261 | 72 | 29 | 9 | 8 | 7 | 4 | 0 |
| <b>HP62</b> | 1293 | 284 | 85 | 14 | 4 | 4 | 4 | 1 | 1 |
| <b>HP63</b> | 1380 | 325 | 97 | 27 | 4 | 3 | 3 | 2 | 0 |

**Taulukko 8: Pienten insertioiden ja deleetioiden (indel) analysoiminen potilaskohtaisesti ja vaiheittain. Indelit: indeliien määrä alussa. Muu peruste: poissuljettu esimerkiksi erityyppiseen sairauteen liittymisen vuoksi. Lopputulos: mahdollisesti patogeeniset indelit, jotka Sanger-sekvensoitiin.**

| Potilas     | Indelit | Geenin alueella | Ei toistojak-sossa | IGV | Muu peruste | Lopputulos |
|-------------|---------|-----------------|--------------------|-----|-------------|------------|
| <b>HP16</b> | 266     | 45              | 23                 | 10  | 1           | 0          |
| <b>HP17</b> | 199     | 28              | 20                 | 6   | 0           | 0          |
| <b>HP18</b> | 284     | 51              | 30                 | 13  | 3           | 0          |
| <b>HP19</b> | 223     | 35              | 23                 | 7   | 1           | 1          |
| <b>HP20</b> | 254     | 49              | 35                 | 12  | 0           | 0          |
| <b>HP21</b> | 280     | 52              | 33                 | 14  | 2           | 0          |
| <b>HP22</b> | 250     | 48              | 30                 | 9   | 0           | 0          |
| <b>HP23</b> | 254     | 45              | 26                 | 7   | 0           | 0          |
| <b>HP24</b> | 244     | 33              | 22                 | 9   | 1           | 0          |
| <b>HP25</b> | 255     | 42              | 25                 | 7   | 0           | 0          |
| <b>HP26</b> | 266     | 51              | 32                 | 6   | 0           | 0          |
| <b>HP27</b> | 235     | 45              | 26                 | 8   | 1           | 0          |
| <b>HP28</b> | 231     | 38              | 22                 | 8   | 1           | 0          |
| <b>HP29</b> | 193     | 33              | 17                 | 6   | 0           | 0          |
| <b>HP30</b> | 201     | 33              | 19                 | 6   | 0           | 0          |
| <b>HP31</b> | 229     | 39              | 21                 | 7   | 0           | 0          |
| <b>HP32</b> | 207     | 26              | 17                 | 8   | 0           | 0          |
| <b>HP33</b> | 255     | 41              | 22                 | 5   | 0           | 0          |
| <b>HP34</b> | 235     | 38              | 20                 | 6   | 0           | 0          |
| <b>HP35</b> | 224     | 33              | 20                 | 9   | 0           | 0          |
| <b>HP36</b> | 204     | 26              | 13                 | 6   | 0           | 0          |
| <b>HP37</b> | 245     | 30              | 15                 | 6   | 1           | 0          |
| <b>HP38</b> | 280     | 36              | 17                 | 5   | 1           | 0          |
| <b>HP39</b> | 254     | 39              | 22                 | 10  | 1           | 0          |
| <b>HP40</b> | 187     | 31              | 21                 | 7   | 4           | 0          |
| <b>HP41</b> | 259     | 48              | 28                 | 7   | 1           | 0          |
| <b>HP42</b> | 222     | 29              | 19                 | 7   | 0           | 0          |
| <b>HP43</b> | 220     | 33              | 21                 | 5   | 0           | 0          |
| <b>HP44</b> | 231     | 38              | 22                 | 5   | 0           | 0          |
| <b>HP45</b> | 228     | 44              | 29                 | 7   | 1           | 0          |
| <b>HP46</b> | 206     | 31              | 21                 | 6   | 1           | 0          |
| <b>HP47</b> | 196     | 29              | 18                 | 8   | 0           | 0          |
| <b>HP48</b> | 146     | 23              | 15                 | 4   | 1           | 0          |
| <b>HP49</b> | 209     | 43              | 28                 | 14  | 2           | 0          |
| <b>HP50</b> | 214     | 38              | 23                 | 7   | 2           | 0          |
| <b>HP51</b> | 238     | 35              | 21                 | 6   | 0           | 0          |



|      |     |    |    |    |   |   |
|------|-----|----|----|----|---|---|
| HP52 | 227 | 39 | 24 | 6  | 1 | 0 |
| HP54 | 226 | 35 | 20 | 6  | 0 | 0 |
| HP55 | 253 | 36 | 20 | 7  | 1 | 0 |
| HP56 | 214 | 30 | 19 | 8  | 0 | 0 |
| HP57 | 239 | 36 | 23 | 7  | 0 | 0 |
| HP58 | 261 | 43 | 29 | 9  | 0 | 0 |
| HP59 | 231 | 31 | 19 | 7  | 1 | 1 |
| HP60 | 249 | 44 | 28 | 10 | 1 | 0 |
| HP61 | 225 | 33 | 20 | 6  | 0 | 0 |
| HP62 | 207 | 32 | 18 | 8  | 0 | 0 |
| HP63 | 244 | 41 | 26 | 8  | 0 | 0 |

### 5.2.2 Lopputulokset

Sanger-sekvensointien ja loppuarvioinnin jälkeen CMT2-potilaista viidelle löytyi mahdollinen sairauden aiheuttanut mutaatio, joten 23 CMT2-potilasta jäi ilman molekulaarista diagnoosia. HSP-potilaista kuudelle löytyi mahdollinen sairauden aiheuttanut mutaatio, joten 14 HSP-potilasta jäi ilman molekulaarista diagnoosia. Tässä tutkimuksessa löytyi vain yksi aikaisemmin tunnettu sairautta aiheuttava mutaatio, sillä muut mutaatiot olivat ennestään tuntemattomia. Sekvensoidut variantit sekä arvio siitä, kuinka todennäköisesti mutaatio on sairautta aiheuttava, ovat taulukossa 9.

**Taulukko 9: Sekvensoidut variantit sekä arvio siitä, onko variantti sairautta aiheuttava (sarakeessa Lopputulos).**

| Lopputulos           | Potilas | Diagnoosi | Geeni           | Eksoni | Mutaatio                                       |
|----------------------|---------|-----------|-----------------|--------|--|
| <b>Varma</b>         | HP19    | CMT2      | <i>HSPB1</i>    | 3      | c.505delA, p.M169Cfs*4<br>(RefSeq NM_001540.3) |
|                      | HP32    | CMT2      | <i>HINT1</i>    | 1      | c.110G>C, p.R37P<br>(RefSeq NM_005340.5)       |
| <b>Todennäköinen</b> | HP28    | CMT2      | <i>GJB1</i>     | 2      | c.300C>A, p.H100Q<br>(RefSeq NM_000166.5)      |
|                      | HP39    | HSP       | <i>KIAA0196</i> | 16     | c.1945A>G, p.I649V<br>(RefSeq NM_014846.3 )    |
|                      | HP40    | HSP       | <i>KIAA0196</i> | 14     | c.1747A>G, p.R583G<br>(RefSeq NM_014846.3)     |
|                      | HP51    | HSP       | <i>KIF1A</i>    | 4      | c.305G>A, p.G102D<br>(RefSeq NM_004321.6)      |

|                         |      |      |                 |    |  |
|-------------------------|------|------|-----------------|----|--|
| <b>Todennäköinen</b>    | HP55 | HSP  | <i>ATL1</i>     | 13 | c.1334C>T, p.A445V<br>(RefSeq NM_015915.4)         |
|                         | HP60 | HSP  | <i>ATL1</i>     | 13 | c.1228G>A, p.G410R<br>(RefSeq NM_001127713.1)      |
| <b>Mahdollinen</b>      | HP29 | CMT2 | <i>ARHGEF10</i> | 28 | c.3413C>T, p.S1134L<br>(RefSeq NM_014629.2)        |
|                         | HP36 | CMT2 | <i>DYNC1H1</i>  | 26 | c.5248G>A, p.V1750M<br>(RefSeq NM_001376.4)        |
|                         | HP47 | HSP  | <i>SPAST</i>    | 15 | c.1637G>A, p.G546E<br>(RefSeq NM_014946.3)         |
| <b>Epätodennäköinen</b> | HP17 | CMT2 | <i>POLG2</i>    | 1  | c.461G>T, p.R154L<br>(RefSeq NM_007215.3)          |
|                         | HP21 | CMT2 | <i>TRPM7</i>    | 26 | c.3737T>A, L1246*<br>(RefSeq NM_017672.5)          |
|                         | HP30 | CMT2 | <i>DNM1L</i>    | 14 | c.1589G>A, L1246*<br>(RefSeq NM_005690.3)          |
|                         | HP31 | CMT2 | <i>LRSAM1</i>   | 8  | c.350T>C, p.M117T<br>(RefSeq NM_001005373.3)       |
|                         | HP59 | CMT2 | <i>POLG2</i>    | 3  | c.714_716delGTT, p.L239del<br>(RefSeq NM_007215.3) |
| <b>Ei varmasti</b>      | HP55 | HSP  | KIAA0196        | 11 | c.1346G>A, p.R449Q<br>(RefSeq NM_014846.3)         |
|                         | HP62 | HSP  | SPAST           | 2  | c.484G>A, p.V162I<br>(RefSeq NM_014946.3)          |

Tärkeimmät kriteerit sille, että varianttia voidaan pitää varmuudella tai todennäköisesti patogeenisena, ovat se, että mutaatio on ennestään tunnettu ja patogeeniseksi todettu ja uusille mutaatioille segregatio perheessä fenotyypin kanssa, harvinaisuus populaatiossa ja funktionaalisten tutkimusten tuoma varmistus. Varmasti tai todennäköisesti CMT2:ta tai HSP:tä aiheuttavan mutaation tulisi olla siis myös harvinainen, joten sitä ei tyypillisesti löytyisi tietokannoista ollenkaan.

Mahdollisesti patogeenisina mutaatioina pidettiin sellaisia variantteja, joita ei saatu varmennettua edellä mainittujen kriteereiden avulla, esimerkiksi sukulaisnäytteiden puuttuessa. Näihin variantteihin

hin pätee kuitenkin usea seuraavista: tunnettujen mutaatioiden fenotyyppi ja mutaatiotyyppi sopii potilaamme kanssa yhteen, aminohappo on hyvin konservoitunut, aminohapon muutos on merkittävä tai mutaatio sijaitsee tärkeässä proteiinin funktionaalisessa domeenissa. Frekvenssit eri tietokannoissa ovat ainakin suurimmaksi osaksi alle 0,001, eli variantti on harvinainen.

Epätodennäköisesti patogeenisilla mutaatioilla yllä mainitut kriteerit eivät täyty. Monessa tapauksessa sukulaisnäytteiden sekvensoinnilla selvisi, ettei variantti segregoidu perheessä fenotyypin kanssa. Frekvenssit näillä mutaatioilla olivat usein suurempia, 0,001-0,005. Varmasti tautia aiheuttamattomina pidettiin sellaisia variantteja, joiden frekvenssi oli yli 0,005 ja näissäkin moni mutaatio ei segregoitunut fenotyypin kanssa perheessä.

### 5.2.3 CMT-potilaiden lopputulokset

HP19-naispotilaalta löytyi heterotsygoottinen, lukukehystä muuttava deleetio, p.M169Cfs\*4 geenistä *HSPB1*, deleetiota ei löytynyt tutkituista tietokannoista. Mutaatio aiheuttaa ennenaikaisen STOP-kodonin syntymisen, joka johtaa proteiinin C-terminaaliosan puuttumiseen. Potilas oli tiettävästi sporadinen tapaus. Terveen sisaren näyte saatiin sekvensoitavaksi ja sisarella deleetiota ei ollut. Potilaan fibroblasteilla tehtiin myös funktionaalisia tutkimuksia, joista kerron myöhemmin. Tutkimukset varmistivat deleetion patogeenisuuden

HP32-naispotilaalta löytyi tämän tutkimuksen ainoa ennestään tunnettu tautimutaatio: homotsygoottinen p.R37P geenistä *HINT1*. Potilaan terve kaksoissisar sekvensoitiin ja hän oli mutaation suhteen negatiivinen. Variantti löytyi 1000 Genomes-tietokannasta frekvenssillä 0,0005 (Suomen populaation osalta 0,005), EVS-tietokannasta frekvenssillä 0,00015 ja Sisu-tietokannasta frekvenssillä 0,00075.

HP28-miespotilaalta löytyi homotsygoottinen pistemutaatio p.H100Q geenistä *GJB1*. Variantti on ennestään tuntematon, eikä sitä löytynyt yhdestäkään tutkitusta tietokannasta. Potilaan terve äiti ja sairas äidin isä saatiin sekvensoitaviksi. Äiti oli mutaation suhteen heterotsygoottinen ja isä homotsygoottinen, joten mutaatio segregoituu fenotyypin kanssa ja on hyvin todennäköisesti sairauden aiheuttanut mutaatio.

HP29-miespotilaalta löytyi heterotsygoottinen p.S1134L geenistä *ARHGEF10*, joka on yhdistetty fenotyyppiin, jossa NCV on alentunut ja ääreishermot vain ohuesti myelinoituja. Tutkituista tietokannoista variantti löytyi vain Sisu-tietokannasta, frekvenssillä 0,000455. Potilaalla on sekamuotoi-

nen, sensomotorinen polyneuropatia. Potilaan isä on myös sairas, mutta hänen näytettään ei ollut saatavissa sekvensointia varten. Koska segregatiota ei pystytty tutkimaan, patogeenisuutta ei pystytty täysin varmistamaan, mutta se on mahdollisesti patogeeninen.

HP36-naispotilaalta, jolla on aksonaalinen sensorinen neuropatia sekä ataksiaa, löytyi heterotsygoottisena p.V1750M geenistä *DYNC1H1* ja varianttia ei löytynyt tutkituista tietokannoista. Koska sukulaisten näytteitä ei ollut saatavilla ja mutaatio on aikaisemmin tuntematon, lopullista varmuutta ei saatu. Variantti on kuitenkin hyvin mahdollisesti tautia aiheuttava mutaatio.

HP17-potilaalta löytyi *POLG2*-geenistä pistemutaatio p.R154L heterotsygoottisena. *POLG2* oli mukana geenipaneelissa mitokondriaalisten funktioidensa takia. Varianttia ei alun perin löytynyt tietokannoista, mutta myöhemmin Sisu-tietokantaa tutkittaessa se löytyi sieltä frekvenssillä 0,0027, joten se ei ollut niin harvinainen mitä alun perin ajateltiin. Potilaan sukulaisista oli myös näytteitä ja variantti sekvensoitiin potilaan äidiltä, isältä ja veljeltä, jotka ovat terveitä. Variantti löytyi isältä ja veljeltä, joten on epätodennäköistä, että se olisi potilaan sairauden aiheuttanut mutaatio.

HP21-naispotilaalta löytyi *TRPM7* L1246\* heterotsygoottisena. Mutaatio vaikutti kiinnostavalta, koska se aiheuttaa ennenaikaisen STOP-kodonin ja sitä ei löytynyt yhdestäkään tutkitusta tietokannasta. Potilaan sukulaisten näytteitä oli saatavilla, joten variantti sekvensoitiin potilaan isältä, äidiltä ja siskolta, jotka ovat kaikki terveitä. Variantti löytyi sekä isältä että siskolta, joten on epätodennäköistä, että variantti olisi patogeeninen.

HP30-naispotilaalta löytyi heterotsygoottinen pistemutaatio p.R530Q geenistä *DNM1L*. Varianttia ei löytynyt tietokannoista, joten sitä pidettiin mahdollisena tautia aiheuttavana mutaationa. Sukulaisten näytteitä saatiin myös sekvensoitavaksi ja variantti ei segregoitunut fenotyyppin kanssa. Tämä variantti siis todennäköisesti ei ole tautia aiheuttava mutaatio.

HP31-miespotilaalta löytyi heterotsygoottinen pistemutaatio p.M117T geenistä *LRSAM1*, joka on liitetty CMT2:een. Potilas on sporadinen ja sukulaisten näytteitä ei ollut saatavilla. Alun perin tutkituista tietokannoista varianttia ei löytynyt, mutta myöhemmin Sisu-tietokantaa tutkittaessa variantin frekvenssi siellä oli 0,0028. Näin suuren frekvenssin vuoksi, variantin ollessa heterotsygoottinen, se ei todennäköisesti ole patogeeninen.

HP59-naispotilaalta löytyi deleetio c.714-716delGTT geenistä *POLG2*, joka ei muuta lukukehystä, mutta sitä ei löytynyt tutkituista tietokannoista. Sukulaisten näytteitä saatiin sekvensoitavaksi potilaan näytteen lisäksi ja deleetio ei segregoitunut fenotyyppin kanssa. On siis hyvin epätodennäköistä että deleetio olisi patogeeninen.

#### 5.2.4 HSP-potilaiden lopputulokset

HP39-miespotilaalta löytyi heterotsygoottinen p.I649V geenistä *KIAA0196*. Alun perin tutkituista tietokannoista sitä ei löytynyt, mutta Sisu-tietokannasta se löytyi frekvenssillä 0,0015. Potilaan sairaan veljen näyte saatiin sekvensoitavaksi ja häneltä löytyi sama variantti, joten se on todennäköisesti tautia aiheuttava mutaatio.

HP40-miespotilaalta löytyi myös heterotsygoottinen pistemutaatio geenistä *KIAA0196*, johtaen aminohappomuutokseen p.R583G. Varianttia ei löytynyt tutkituista tietokannoista. Sukulaisista saatiin sekvensoitaviksi sairastuneet potilaan sisar sekä sisaren poika, joilla kummallakin oli sama variantti kuin potilaallamme. Variantti siis segregoitui fenotyypin kanssa, joten se on hyvin todennäköisesti patogeeninen.

HP51-potilas on kehitysvammainen tyttö, jolla on aikaisin alkanut HSP. Sairaus on sporadinen. Potilaalta löytyi *KIF1A* p.G102D-pistemutaatio heterotsygoottisena, eikä sitä löytynyt tutkituista tietokannoista. *KIF1A*-variantti sekvensoitiin potilaan isältä ja äidiltä, jotka ovat terveitä ja heiltä mutaatiota ei löytynyt. Muutos on siis *de novo*- mutaatio ja todennäköisesti patogeeninen.

HP55-miespotilaalta löytyi heterotsygoottiset pistemutaatiot p.A445V geenistä *ATL1* sekä p.R449Q geenistä *KIAA0196*. Alun perin tutkituista tietokannoista ei kumpaakaan varianttia löytynyt. Myöhemmin tosin huomattiin, että *KIAA0196*-variantin frekvenssi oli Sisu-tietokannassa 0,01278. Sukulaisten DNA-näytteitä saatiin sekvensoitavaksi kaikkiaan 10, joista osa oli terveitä ja osa sairaita. Periytymismallin oletettiin olevan autosomaalisesti dominoiva. Kaikilla kuudella sairaalla sukulaisella oli *ATL1*-variantti, mutta ei *KIAA0196*-varianttia. Lisäksi kaikki tutkitut, joilla oli *KIAA0196*-variantti, olivat terveitä. *ATL1*-variantti on siis hyvin todennäköisesti sairautta aiheuttava mutaatio ja *KIAA0196*-variantti ei varmasti ole patogeeninen.

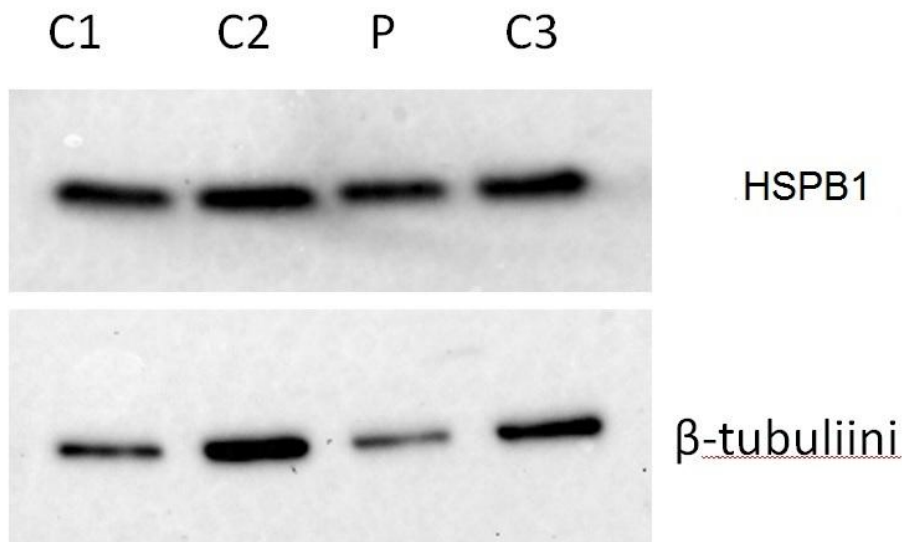
HP60-miespotilaalta löytyi heterotsygoottinen pistemutaatio p.G410R geenistä *ATL1*, jota ei löytynyt tutkituista tietokannoista. Potilaan sukulaisnäytteitä oli saatavilla, kaksi sairasta ja yksi terve. *ATL1*-variantti löytyi sairailta sukulaisilta ja terveeltä ei. Tämä mutaatio on siis hyvin todennäköisesti patogeeninen.

HP47-naispotilaalta löytyi heterotsygoottinen pistemutaatio p.G546E geenistä *SPAST*. Varianttia ei löytynyt tietokannoista. Potilaalla on HSP:stä vaikea monioireinen muoto. Sukulaisten näytteitä ei ollut saatavilla, joten lopullista varmistusta ei saatu. Variantti on kuitenkin hyvin mahdollisesti potilaan sairauden aiheuttanut mutaatio.

HP62-potilaalta löytyi heterotsygoottinen pistemutaatio p.V162I geenistä *SPAST*. Alun perin tutkittuista tietokannoista variantti löytyi 1000 genomes- ja EVS-tietokannoista frekvenssillä 0,001. Sukulaisten näytteitä ei ollut saatavissa. Myöhemmin Sisu-tietokantaa tutkittaessa havaittiin kuitenkin variantin frekvenssin olevan siellä 0,012. Tämä variantti ei siis varmasti ole patogeeninen.

### 5.3 Western blot

Western blot tehtiin CMT2-potilaan fibroblasteista eristetyille proteiineille. Potilaalla oli heterotsygoottinen pistemutaatio p.R127L *HSPB1*-geenissä. Vasta-aineena oli anti-HSPB1 ja latauskontrollina  $\beta$ -tubuliini. Kuva Western blotista on kuvassa 5. Proteiinin määrä eri näytteissä vaihteli hiukan, mikä selvisi latauskontrollilla. Myöhemmin saatiin fibroblastinäyte myös tässä tutkimuksessa olleelta HP19-potilaalta, jolta löytyi ennenaikaisen STOP-kodonin aiheuttava deleetio *HSPB1*-geenissä. Siitä tehtiin Western blot sekä muita funktionaalisia tutkimuksia, joista kerron lisää myöhemmin.



Kuva 5: Western blot CMT2-potilaan fibroblasteista eristetyistä proteiineista. C1-C3: kontrolli, P: CMT2-potilas,  $\beta$ -tubuliini oli latauskontrollina.

## **6. Tulosten tarkastelu**

### **6.1 Kohdennetun uuden sukupolven sekvensointimenetelmän onnistuminen**

#### **6.1.1 Sekvensointi**

Keskimäärin 81,2 % kohteista oli katettu vähintään 20-kertaisesti, mikä on kohtuullisen hyvä tulos. Ihanteellisesti 20x lukupeitto olisi saatu noin 95 % kohteista, josta jäätin kauas. Potilaskohtaisesti eroja oli jonkun verran, mutta parhaimmillaankin 20x lukupeitto oli vain 88,7 % kohteista. Keskimääräinen lukupeitto oli 133-kertainen. Yhden potilaan näyte myös epäonnistui eikä päässyt mukaan sekvensoitavaksi. Tulos saataisiin ehkä paremmaksi suunnittelemalla koettimet paremmin. Toisaalta lukupeittoon vaikuttaa myös se, kuinka paljon tehtyä kirjastoa sekvensoidaan, eli olisi voitu myös suoraan sekvensoida lisää. Monissa muissa kohdennetuissa NGS-tutkimuksissa on saatu parempia lukupeittoja. Esimerkiksi Hoyer et al. CMT-tutkimuksessa 30x lukupeitto oli 98,7 % ja keskimääräinen lukupeitto 516 kertaa (Hoyer et al. 2014), Kumar et al. HSP-tutkimuksessa 30x lukupeitto oli 93,5 % ja keskimääräinen lukupeitto 107 kertaa (Kumar et al. 2013).

Osa halutusta alueesta jäi myös sekvensoimatta, minkä voi huomata siitä, että kaksinkertaisella lukupeitollakin oli sekvensoitu vain noin 95 % emäksistä, mutta se on yksi tämän menetelmän puutteista. Puuttuvien alueiden Sanger-sekvensointi on työlästä ja lisää kustannuksia, joten se ei usein ole järkevää.

#### **6.1.2 Varianttien analysointi**

Pistemutaatioiden analysoinnissa suodatettiin pois variantit, joiden frekvenssi 1000 Genomes-tietokannassa oli yli 0,005. Lisäksi suodatettiin pois eksonien ulkopuolisella alueella olevat variantit, sekä variantit, jotka eivät muuttaneet aminohappoa. Variantit tarkistettiin IGV-ohjelmalla. Jäljelle jääneitä variantteja etsittiin vielä EVS-eksomitietokannasta ja 1000 Genomes-tietokannasta suomalaispopulaation frekvenssejä. Kyseisistä geeneistä etsittiin myös niihin liitettyjä sairauksia ja mutaatioita. Pienten insertioiden ja deleetioiden analysoinnissa suodatettiin pois eksonien ulkopuoliset alueet sekä toistojaksoalueet. Myös indelit tarkistettiin IGV:llä ja niitä etsittiin eri tietokannoista. Kaikki lopulliset variantit, eli ne joita pidettiin mahdollisina sairautta aiheuttavina mutaatioina, varmistettiin Sanger-sekvensoinnilla.

Analysointi tehtiin järjestelmällisesti ja rationaalisesti. Analysointi perustui suurelta osin frekvensseihin. Oletettiin, että sairauden aiheuttanut mutaatio olisi hyvin harvinainen, koska sekä CMT2 että HSP ovat harvinaisia. Lisäksi sairaudet ovat hyvin heterogeenisiä, joten yksittäisen tautia aiheuttavan mutaation täytyy olla hyvin harvinainen. Frekvenssien rajat (1000 Genomes-tietokannan osalta  $<0,005$  ja EVS-tietokannassa  $<0,002$ ) ovat yleisesti käytettyjä ja sopivat hyvin dominoivien ja myös resessiivisten tautimutaatioiden etsimiseen, suurella osalla potilaista kun odotettiin dominanttia tautimutaatiota, mutta osalla periytyminen oli resessiivistä (Hoyer et al. 2014). Analysoinnin ensimmäiset vaiheet olivat nopeita ja helppoja tehdä ja niiden avulla päästiin kohtuullisen kokoisiin varianttimääriin, joita tutkia yksityiskohtaisemmin. Indelien analysointi on myös tärkeää ja tässäkin tutkimuksessa löytyi yksi varmasti patogeeninen deleetio.

Analysoinnissa silmukoitumiskohdat (splice site) saattoivat jäädä analysoimatta, koska suodatusvaiheessa ohitettiin kaikki intronialueet. Jatkossa suodatusvaiheen voisi toteuttaa niin, että mahdolliset silmukointikohdat otettaisiin mukaan. Tunnetut CMT:tä ja HSP:tä aiheuttavat mutaatiot ovat tosin useimmin olleet missense-mutaatioita, joten silmukointimutaation todennäköisyys on aika pieni. Toisaalta tutkimuksissa ei usein luultavasti ole etsitykään silmukointimutaatioita, joten niitä saattaa todellisuudessa olla enemmän kuin tiedetään.

Analysoinnissa ei käytetty hyväksi mutaatioiden haitallisuutta ennustavia ohjelmia, koska niiden oikeellisuudesta ei ole takeita. *HINT1*-mutaatio oli ainoa löytämämme ennestään tunnettu tautimutaatio ja sille SIFT Genome Tool-ohjelman ennuste oli ”tolerated” eli ei patogeeninen. Suodattamisessa ei myöskään hyödynnetty dbSNP-tietokantaa, koska siellä on nykyisin mukana myös paljon patogeenisiä mutaatioita. IGV:n avulla saatiin runsaasti vääriä positiivisia suodatettua pois ja myös varmennettua variantteja sekä havaittua intronisia variantteja. IGV olikin korvaamaton apu.

Variantteja suljettiin pois myös sillä perusteella, mihin sairauksiin niitä on aiemmin assosioitu. Tämä on hiukan vaarallista, koska joihinkin geeneihin on liitetty monia sairauksia ja hyvinkin erilaisia sairauksia. Jonkun verran variantteja suljettiin pois myös sillä perusteella, ettei HSP:tä ja CMT2:ta voisi aiheuttaa sama geeni, mutta tämä ei välttämättä pidä paikkaansa. Esimerkiksi HSP:hen liittyvät geenit *ATL1*, *NIPAI* ja *SPAST* voivat aiheuttaa myös ääreishermoston neuropatiaa ja *BSCL2*-geeni liittyy Silver-syndroomaan, jonka oireilla on yhteistä sekä HSP:n että CMT:n kanssa (Timmerman, Clowes & Reid 2013). Pidettiin myös epätodennäköisenä, että tautimutaatio voisi olla dominoiva, jos aiemmat tunnetut mutaatiot olivat kaikki resessiivisiä. Tässäkin piilee mahdollinen virhelähde, koska esimerkiksi *GDAP1*-geeni liittyy sekä resessiivisesti että dominoivasti periytyvään CMT:hen (Cassereau et al. 2011).



## 6.2 HSP- ja CMT-potilaiden molekulaarisen diagnoosin selvittäminen

Suurinta osaa löydetystä mahdollisista tautia aiheuttavista mutaatioista ei voida täysin varmistaa, koska yhtä lukuunottamatta kyseessä oli ennestään tuntematon mutaatio. Näiden oikeellisuutta voidaan arvioida esimerkiksi aminohapon konservoitumisella, aminohapon muutoksen merkittävyydellä ja pohtimalla mutaation funktionaalisia vaikutuksia proteiinin toimintaan. Kaikki lopulliset variantit ovat hyvin harvinaisia, muuttavat aminohapon (yhtä deleetiota lukuun ottamatta) ja ne on varmistettu Sanger-sekvensoinnilla. Lisävarmistusta voidaan saada sekvensoimalla myös sukulaisten näytteitä, mutta kaikilta potilailta sukulaisnäytteitä ei ollut saatavissa. Lopullinen varmennus saataisiin funktionaalisilla tutkimuksilla tai jos mutaatio olisi löydetty monelta muultakin potilaalta eri tutkimuksissa. Sukulaisnäytteiden kohdallakin on mahdollinen virhelähde: sekä CMT että HSP voivat puhjeta vasta vanhemmalla iällä, joten terve sukulainen saattaa olla tulevaisuudessa sairas. Yllättävää tuloksissa oli, että löytyi vain yksi tunnettu tautimutaatio. HSP-potilaiden osalta patogeenisiä mutaatioita yleisimmissä sairauteen liittyvissä geeneissä (*SPAST*, *ATL1*, *REEP1*) löytyi suhteellisen vähän. CMT-potilaiden osalta yleisimmät sairauteen liittyvät geenit (*MFN2*, *GDAP1*) olikin monen potilaan osalta sekvensoitu jo ennen tätä tutkimusta.

HSP-potilaista oli usein vain vähän taustatietoja saatavilla, mikä hankaloitti analysointia. Esimerkiksi monen potilaan osalta ei ollut tiedossa, onko potilaan sairaustyyppi moni- vai yksioireinen, tai oliko sairaus sporadinen vai perinnöllinen.

Kiinnostavien varianttien Sanger-sekvensointi saatiin onnistumaan kaikissa tapauksissa luotettavasti, eikä yksikään variantti osoittautunut vääräksi. Sanger-sekvensointi ei siis ole välttämättä tarpeellista, jos lukupeitto variantin alueella on alun perin tarpeeksi hyvä. Seuraavissa kappaleissa arvioin lopullisten varianttien patogeenisuutta, sekä pohdin syitä siihen, miksi suurelle osalle potilaista ei löydetty sairauden aiheuttanutta mutaatiota.

### 6.2.1 Mutaatioiden patogeenisuuden arviointi

Täysin varmana tautimutaationa varianttia voidaan pitää vain, jos vähintään kaksi seuraavista ehdoista täyttyy: mutaatio segregoituu suvussa fenotyypin kanssa (mielellään useammalla henkilöllä), funktionaaliset tutkimukset osoittavat mutaation patogeeniseksi tai mutaatio on ennestään tunnettu tautia aiheuttavana. Jos ehdoista vain yksi täyttyy, voidaan mutaatiota pitää kuitenkin hyvin todenn

näköisesti patogeenisena. Yleisesti mutaation patogeenisuutta tukee tunnettujen geeniin liitettyjen fenotyyppien ja periytymismallin sopiminen potilaan vastaaviin, mutaation läheisyys tunnettuun patogeeniseen mutaatioon, aminohapon konservoituneisuus, merkittävä aminohapon muutos ja se, jos mutaatio sijaitsee funktionaalisen domeenin alueella. Kaikkien sekvensoitujen mutaatioiden frekvenssit 1000 Genomes- ja EVS-tietokannoissa olivat pieniä tai niitä ei löytynyt ollenkaan. Myöhemmin variantteja pystyttiin tarkistamaan myös Sisu-tietokannasta, joka muutti arviota joidenkin mutaatioiden suhteen. Sisu-tietokanta onkin merkittävä työkalu. Mutaatioiden patogeenisuuden arviointi on loppujen lopuksi kuitenkin tehtävä tapauskohtaisesti, sillä aukottomia, yksiselitteisiä sääntöjä on vaikea tehdä.

#### *6.2.1.1 Varmasti ja todennäköisesti patogeeniset mutaatiot*

HP19-potilaalta, jolla on CMT2, löytyi heterotsygoottinen, lukukehystä muuttava deleetio, p.M169Cfs\*4 geenistä *HSPB1*, joka aiheuttaa ennen aikaisen STOP-kodonin syntymisen. STOP-kodonin aiheuttavat mutaatiot ovat yleisesti ottaen usein haitallisia, joten tätä mutaatiota pidettiin todennäköisesti patogeenisena. Potilaan terve sukulainen saatiin myös myöhemmin sekvensoitavaksi ja hänellä deleetiota ei ollut. *HSPB1* on ns. chaperoniproteiini. Chaperoniproteiinit suojelevat solua väärin laskostuneiden proteiinien aiheuttamilta vaurioilta. Ne sitovat väärin laskostuneet proteiinit ja estävät niiden aggregoitumisen. Sen jälkeen toiset proteiinit joko uudelleen laskostavat proteiinin tai hajottavat sen (Basha, O'Neill & Vierling 2012). Venäläisellä AD-CMT2-perheellä, joilta löydettiin *HSPB1*-mutaatio, oli oireina etenevä symmetrinen lihasheikkous ja -kato raajojen lihaksien ääriosoissa ja jännerefleksit olivat alentuneet tai puuttuivat. Alkamisikä oli 15–25-vuotiaana (Evgrafov et al. 2004). Taudinkuva siis sopi potilaamme fenotyyppiin, samoin dominoiva periytyminen. Tutkimusryhmä jatkoi mutaation tutkimista ja se todettiin tutkimustulosten perusteella patogeeniseksi. Jatkotutkimuksista kerron lisää myöhemmässä kappaleessa.

HP32-CMT2-potilaalta löytyi ennestään tunnettu tautimutaatio, homotsygoottinen p.R37P geenissä *HINT1*. Kyseinen aminohappo on konservoitunut vain simpanssilla, makakilla, hiirellä ja rotalla. Mutaation frekvenssi 1000 Genomes-tietokannassa oli 0,0005, EVS-tietokannassa 0,0002 ja 1000 Genomes-frekvenssi suomalaiselle populaatiolle 0,005. Sisu-tietokannassa frekvenssi oli 0,00075. Mutaatio sekvensoitiin myös potilaan terveeltä kaksoissisarelta, jolta mutaatiota ei löytynyt. Mutaatio p.R37P on aiemmin tunnettu autosomaalisesti resessiivistä aksonaalista neuropatiaa sekä neuro-myotoniaa aiheuttavana mutaationa. Potilailla, joilla oli *HINT1*-mutaatio, oli enemmän liikeoireita ja alkamisikä oli 3–25 vuotta (keskimäärin 10 vuotta) (Zimon et al. 2012). *HINT1*-mutaatioiden aiheuttama fenotyyppi sopi potilaamme fenotyyppiin. Toisessa tutkimuksessa *HINT1*-mutaatioita

löydettiin 19 tsekkiläisestä perheestä ja 95 % mutaatioista oli juuri p.R37P-mutaatioita. Tutkimuksessa myös havaittiin, että neuromyotoniaa ei useimmilta potilailta ollut alun perin havaittu tai edes tutkittu, mutta uusissa tutkimuksissa neuromyotonia oli lähes kaikilla potilailla, joilta *HINT1*-mutaatiokin löytyi (Lassuthova et al. 2015). Aminohappo 37 sijaitsee katalyyttisen ytimen alueella. Mutatoitunut *HINT1* ei ekspressoidu normaalisti ja sen entsyymaattinen aktiivisuus on heikentynyt. *HINT1*-mutaatioiden patogeeninen mekanismi on tosin vielä epäselvä (Zimon et al. 2012). Koska mutaatio on ennestään tunnettu, se on varmasti tautia aiheuttava.

HP28-miespotilaalta löytyi homotsygoottinen pistemutaatio p.H100Q geenistä *GJB1*, joka sijaitsee X-kromosomissa. Mutaatio segregoitui suvussa fenotyyppin mukaan: potilaan terve äiti on mutaation suhteen heterotsygoottinen ja potilaan äidin sairastunut isä homotsygoottinen. Aminohappo H100 on konservoitunut laajasti eri eliöillä ja lisäksi *GJB1*:n aminohapposekvenssi on kokonaisuudessaan hyvin konservoitunut. Tätä varianttia ei löytynyt tutkituista tietokannoista. *GJB1*-mutaatiot aiheuttavat välimuotoista CMT:n muotoa, jossa tapahtuu sekä myeliinin hajoamista että aksonien vaurioitumista. Vaikka potilas oli diagnosoitu CMT2:ksi, välimuotoisen CMT:n oireet sopivat kuitenkin potilaan fenotyyppiin. *GJB1*:stä tunnetaan runsaasti CMT:tä aiheuttavia mutaatioita (noin 400), joista missense-mutaatiot lienevät yleisimpiä. On spekuloitu että kaikki aminohappoa muuttavat mutaatiot tässä geenissä olisivat patogeenisia. Mutaatioiden tyypillä tai alueella ei ole huomattu olevan yhteyttä potilaan fenotyyppiin tai sairauden vaikeusasteeseen. Aminohappo 100 sijaitsee *GJB1*:n intrasellulaarisessa osassa. *GJB1* kuuluu konneksiineihin, jotka muodostavat yhdessä aukkoliitoksia. *GJB1*-mutaatiot saattaisivat aiheuttaa pienten molekyylien ja ionien diffuusion heikentymistä ääreishermoston myeliinikerroksessa. Mutaatio voisi estää aukkoliitoskanavan syntymisen, aiheuttaa kanavan väärän koon tai vaikuttaa sen sulkeutumiseen (Bergoffen et al. 1993, Kleopa, Abrams & Scherer 2012, Patzko, Shy 2011). Potilaamme mutaatio on hyvin todennäköisesti sairauden aiheuttava mutaatio, koska se segregoituu suvussa, geeniin liitetty fenotyyppi ja periytymismalli sopivat ja lisäksi aminohappo on hyvin konservoitunut. Täydelliseen varmuuteen päästäisiin vain funktionaalisilla kokeilla tai jos mutaatiota löytyisi muiltakin CMT-potilailta.

Kahdelta HSP-potilaalta löytyi heterotsygoottinen pistemutaatio geenistä *KIAA0196*. HP40-potilaan mutaatio oli p.R583G. Sukulaisista saatiin sekvensoitaviksi potilaan sairastunut sisar sekä sairastunut veljenpoika, joilla kummallakin oli sama mutaatio kuin potilaallamme. Aminohappo R583 on hyvin konservoitunut. Varianttia ei löytynyt tutkituista tietokannoista. HP39-potilaalta löytyi mutaatio p.I649V. Potilaan sairaan veljen näyte saatiin sekvensoitavaksi ja häneltä löytyi sama mutaatio. Aminohappo I649 on myös hyvin konservoitunut. Mutaatiota ei löytynyt alun perin tutkituista tietokannoista, mutta myöhemmin se löytyi Sisu-tietokannasta frekvenssillä 0,0015. Frekvenssi on

korkeampi mitä dominoivalta mutaatiolta odottaisi, mutta variantti on silti harvinainen. Mutaatiot *KIAA0196*-geenissä aiheuttavat yksioireista HSP:tä dominoivasti ja tunnetut mutaatiot ovat olleet missense-mutaatioita. Fenotyyppi ja periytymismalli siis sopivat kummankin potilaan fenotyyppiin. *KIAA0196* on WASH-kompleksin osa ja lisäksi *KIAA0196* on mahdollisesti mukana BMP-signaloinnissa. *KIAA0196*-mutaatioiden patogeeninen mekanismi on vielä epäselvä. Kummankin potilaan mutaatiot sijaitsevat Spectrin-repeat-domeenin alueella (aminohapot 240–791) (Clemen et al. 2010, Freeman, Seaman & Reid 2013, Valdmanis et al. 2007). Kummatkin mutaatiot siis segregoituvat fenotyypin kanssa ja sopivat potilaiden fenotyyppihin, joten ne ovat todennäköisesti tautia aiheuttavia mutaatioita.

HP51-potilas on kehitysvammainen tyttö, jolla on aikaisin alkanut sporadinen HSP. Potilaalta löytyi geenistä *KIF1A* G102D-mutaatio heterotsygoottisena. Aminohappo on hyvin konservoitunut. Potilaan mutaatio sijaitsee *KIF1A*:n moottoridomeenin alueella. Mutaatiota ei löytynyt tutkituista tietokannoista ja terveiltä vanhemmilta mutaatiota ei löytynyt, joten mutaatio oli de novo. *KIF1A*:n non-sense-mutaatiot aiheuttavat HSAN-tautia ja homotsygoottiset missense-mutaatiot moottoridomeenissa HSP:tä resessiivisesti. HSP on monioireista muotoa, johon liittyy esimerkiksi pikkuaivo-peräistä ataksiaa (Klebe et al. 2012). *KIF1A*:han liittyen on kuvattu myös älyn vammaa mahdollisesti aiheuttanut de novo mutaatio p.Thr99Met, joka oli siis lähellä oman potilaamme mutaatiokohdtaa (Hamdan et al. 2011). Koska potilaallamme oli kehitysvammaa, de novo *KIF1A*-mutaation ajateltiin sopivan potilaamme fenotyyppiin, joten mutaatiota pidettiin mahdollisena tautimutaationa. Samanaikaisesti oman löytöämme kanssa löytyi vastaavia tapauksia samantyyppisillä *KIF1A*-mutaatioilla muista maista. *KIF1A* on neuronispesifinen moottoriproteiini ja se on mukana synaptisten vesikkelien nopeassa kuljetuksessa aksoneita pitkin (anterograde transport) (Lee et al. 2015). Mutaatio on hyvin todennäköinen tautimutaatio, koska se on *de novo*-mutaatio ja sopii fenotyyppiin. Kerron *KIF1A*-mutaatioista ja funktioista vielä lisää myöhemmässä kappaleessa.

HP55-potilaalta, jolla oli HSP, löytyi heterotsygoottiset pistemutaatiot p.A445V geenistä *ATL1* sekä p.R449Q geenistä *KIAA0196*. Kumpikin aminohappo on hyvin konservoitunut ja kummankin geenin mutaatiot aiheuttavat yksioireista, dominoivaa HSP:tä ja alun perin tutkituista tietokannoista ei löytynyt kumpaakaan varianttia. Kumpikin variantti vaikutti siis yhtä todennäköiseltä tautimutaatiolta. Myöhemmin Sisu-tietokannasta tosin huomattiin, että *KIAA0196*-variantti onkin Suomessa yleinen. Useiden sukulaisnäytteiden sekvensoinnilla *ATL1*-mutaatio segregoitui fenotyypin kanssa, kun taas *KIAA0196*-varianttia oli ainoastaan terveillä sukulaisilla. *ATL1*-mutaatiot aiheuttavat siis autosomaalisesti dominoivaa HSP:tä, yksioireista muotoa. *ATL1*-mutaatiot aiheuttavat noin 10 % autosomaalisesti dominoivista HSP-tapauksista. Tunnetut mutaatiot ovat enimmäkseen missense-

mutaatioita. Muutamassa eksonissa on ollut eniten tautia aiheuttavia mutaatioita, mutta potilaamme mutaatio ei sijainnut yhdessäkään näistä eksoneista (Namekawa et al. 2006). *ATL1* on GTPaasi putkimaisessa ER:ssä, jossa se on interaktioissa useiden ER:ää muokkaavien proteiinien kanssa. *ATL1*:n patogeeniset mutaatiot ovat dominantti-negatiivisia. Ne häiritsevät putkimaisen ER-verkoston muodostamista ja aksonien pidentämistä neuroneissa (Park et al. 2010). Aminohappo 445 sijaitsee *ATL1*:n keskiosassa (mid-portion, aa 314–448). *ATL1* on mukana vesikkelikuljetuksessa ER:n ja Golgin välillä. Useat *ATL1*-mutaatiot estävät uusien vesikkelien irtoamisen muodostumispaikastaan, joka vaikuttaa Golgin morfogeneesiin (Namekawa et al. 2007). Muun muassa segregaat-ion perusteella *ATL1*-mutaatio on hyvin todennäköisesti tautia aiheuttava mutaatio.

HP60-HSP-potilaalta löytyi myös heterotsygoottinen pistemutaatio geenistä *ATL1*, p.G410R. Sukulaisnäytteitä oli saatavilla ja mutaatio segregoitui sairauden kanssa. Myös aminohappo 410 on hyvin konservoitunut. Tätäkään mutaatiota ei löytynyt tutkituista tietokannoista. *ATL1*-mutaatioiden aiheuttama taudinkuva sopi potilaamme fenotyyppiin. Myös aminohappo 410 sijaitsee *ATL1*:n keski-osassa. Segregaation perusteella tämä on hyvin todennäköinen tautia aiheuttava mutaatio.

#### 6.2.1.2 Mahdolliset tautimutaatiot

Mahdolliset tautimutaatiot ovat niitä, joilta potilaiden sukulaisnäytteitä ei ollut saatavissa ja variantit olivat ennestään tuntemattomia, mutta ne vaikuttivat muuten mahdollisilta tautia aiheuttavilta mutaatioilta. Patogeenisuus jää kuitenkin arvailun varaan ilman funktionaalisia kokeita tai variantin löytymistä sairailta sukulaisilta tai muilta potilailta.

HP29-miespotilaalta, jolla oli diagnosoitu CMT2, löytyi heterotsygoottinen pistemutaatio p.S1134L geenistä *ARHGEF10*. Aminohappo on hyvin konservoitunut. Varianttia ei löytynyt muista tietokannoista, paitsi Sisu-tietokannasta, jossa sen frekvenssi oli 0,0005. *ARHGEF10*-geeniin on liitetty fenotyyppi, jossa NCV on alentunut ja ääreishermot ovat ohuesti myelinoituja ja tämä fenotyyppi sopi yhteen potilaamme fenotyypin kanssa. Tosin potilaamme variantti sijaitsi eri alueella geeniä kuin aiemmin löydetty mutaatio (Verhoeven et al. 2003b). *ARHGEF10* on mahdollisena neuropatiaan liittyvänä geeninä vielä huonosti tunnettu ja lisäksi potilaan sukulaisnäytteitä ei saatu sekvensoitavaksi. Variantti on kuitenkin mahdollisesti tautia aiheuttava.

HP36-naispotilaalta, jolla on CMT2 sekä ataksiaa, löytyi heterotsygoottisena pistemutaatio p.V1750M geenistä *DYNC1H1*. Aminohappo 1750 on hyvin konservoitunut. *DYNC1H1* on liitetty dominanoivasti periytyvään CMT2:een. *DYNC1H1* koostuu Stem-domeenista ja moottoridomeenista ja potilaamme variantti sijaitsee stem-domeenin alueella, lähellä moottoridomeenia (Wee-

don et al. 2011). DYNC1H1 on liitetty myös spinaaliseen muskulaariseen atrofiaan (SMALED) sekä kehitysvammaisuuteen, eli geenin mutaatiot voivat aiheuttaa useanlaisia neurologisia sairauksia. Kaikki tunnetut patogeeniset mutaatiot ovat olleet dominoivia missense-mutaatioita. Mutaatioita tunnetaan myös geenin eri osissa. Varianttia ei löytynyt tutkituista tietokannoista. Koska sukulaisnäytteitä ei ollut saatavilla, eikä mutaatio ole aikaisemmin tunnettu, se on hyvin mahdollisesti sairauden aiheuttanut mutaatio, mutta sitä ei voitu lopullisesti varmentaa.

HP47-potilaalta, jolla on monioireinen HSP, löytyi heterotsygoottinen pistemutaatio p.G546E geenistä *SPAST*. *SPAST*-mutaatiot ovat yleisimpiä HSP:n aiheuttajia. Aminohappo on hyvin konservoitunut. Potilaan *SPAST*-mutaatiota ei löytynyt lainkaan tutkituista tietokannoista. Potilaan mutaatio sijaitsee AAA (ATPases associated with diverse cellular activities) ATPaasi-domeenissa, sen loppuosassa (alue aa 342–599). Tässä domeenissa on spastiinin entsymaattinen aktiivisuus, jota tarvitaan mikrotubulusten katkomista (breakage) varten (Blackstone 2012). *SPAST*-mutaatioita tunnetaan runsaasti ja kaikenlaisia mutaatiotyyppisiä. Tautia aiheuttavana mekanismina lienee haploinsuffisienssi. Eri mutaatiotyypeillä ei ole yhteyttä potilaan fenotyypin kanssa (esim. missense-mutaatiot vs. deletiot) (Depienne et al. 2006). Vaikka *SPAST*-mutaatiot on yleensä liitetty yksioireiseen HSP-muotoon, on myös joillakin potilailla havaittu kognitiivisia häiriöitä ja pikkuaivoihin liittyviä oireita, jotka viittaisivat monioireiseen muotoon. Tämä sopisi potilaamme taudinkuvaan. Mutaatio sopii potilaan taudinkuvaan ja sijaitsee hyvin konservoituneella alueella, muuttaen merkittävästi aminohappoa ja näin ollen luultavasti myös funktiota. Mutaatio on siis hyvin mahdollisesti tautimutaatio, mutta ilman sukulaisnäytteitä asiaa ei voida täysin vahvistaa.

#### 6.2.1.3 Potilaat, joille ei löytynyt sairauden aiheuttanutta mutaatiota

Osa sekvensoiduista varianteista ei segregoitunut suvussa, joten on epätodennäköistä, että kyseessä olisi tällöin tautia aiheuttava mutaatio. Osa varianteista taas osoittautui epätodennäköisiksi tarkemmassa arvioinnissa.

Usealta potilaalta löytyi kiinnostava variantti, jotka eivät tosin olleet neuropatiaan tai paraplegiaan liittyvissä geeneissä. Potilas HP17:ltä, jolla oli CMT2, löytyi *POLG2*-geenistä pistemutaatio p.R154L, joka vaikutti kiinnostavalta: aminohappo on konservoitunut, eikä sitä löytynyt alun perin tutkituista tietokannoista. Se ei kuitenkaan segregoitunut suvussa fenotyypin mukaisesti. HP21-potilaalta, jolla oli CMT2, löytyi kiinnostava *TRPM7*-variantti, nonsense-mutaatio L1246\*, joka oli myös konservoitunut, eikä sitä löytynyt tietokannoista. Se kuitenkin saatiin poissuljettua sukulaisnäytteiden avulla. HP30-potilaalta, jolla oli CMT2, löytyi heterotsygoottinen pistemutaatio p.R530Q geenistä *DNM1L*. Tämäkin aminohappo on konservoitunut ja sitä ei löytynyt tietokannois-

ta, mutta mutaatio voitiin sulkea pois sukulaisnäytteiden vuoksi. Potilaalta HP69 löytyi lukukehystä muuttamaton deleetio geenistä *POLG2*, mutta se ei segregoitunut suvussa.

HP31-potilaalta löytyi heterotsygoottinen pistemutaatio p.M117T geenistä *LRSAM1*. Potilaalla on CMT2. Aminohappo on konservoitunut vain rhesus-apisella. Varianttia ei löytynyt 1000 genomes- ja EVS-tietokannoista, mutta Sisu-tietokannassa frekvenssi oli 0,0029, joka on jo liian suuri dominoivaksi patogeeniseksi mutaatioksi. *LRSAM1* on aiemmin yhdistetty autosomaalisesti resessiiviseen CMT2:een, joskaan se ei sulje pois mahdollisuutta myös dominanteista mutaatioista (Guernsey et al. 2010). OMIM-tietokannassa tunnetut mutaatiot ovat silmukointikohtiin liittyviä ja tunnetaan myös yksi patogeeninen insertio, mutta nämä ovat erityyppisiä mutaatioita kuin potilaallamme. Sukulaisnäytteitä ei ollut saatavissa. Koska fenotyyppi, periytyminen ja tunnetut mutaatiotyypit eivät sovi potilaaseemme, aminohappo ei ole konservoitunut ja variantti löytyy Sisu-tietokannasta liian suurella frekvenssillä, se on epätodennäköisesti tautia aiheuttava mutaatio.

HP62-HSP-potilaalta löytyi heterotsygoottinen pistemutaatio p.V162I geenistä *SPAST*. Sukulaisnäytteitä ei ollut saatavissa. Aminohappo on hyvin konservoitunut. Frekvenssit olivat 1000 Genomes-tietokannassa 0,001 (Suomen populaatiolla 0) ja EVS-tietokannassa 0,001. Sisu-tietokannassa frekvenssi oli 0,012, joka viittaa jo polymorfismiin, vaikka *SPAST*-geenin polymorfismeja ei juuri tunneta (McDermott et al. 2006). Variantti sijaitsee tärkeässä MIT-domeenissa (microtubule interacting and trafficking domain), joka muodostaa kolmen helixin ryhmän, joka liittyy spastiinin interaktioihin. MIT-domeeni on elintärkeä spastiinin siirtymiselle endosomeihin (Blackstone 2012). Tämä variantti vaikutti alun perin mahdolliselta tautia aiheuttavalta mutaatiolta, mutta Sisu-tietokannan frekvenssi on niin korkea, että on epätodennäköistä, että tämä variantti olisi patogeeninen.

Suurelle osalle potilaista ei varianttien analysoinnin jälkeen jäänyt jäljelle yhtään mahdollista tautia aiheuttavaa mutaatiota. Näillä potilailla on todennäköisesti mutaatio jossakin geenissä joka ei sisällynyt geenipaneeliin, CMT:hen ja HSP:hen liittyviä geenejä kun löydetään jatkuvasti lisää. Nämä potilaat ovatkin hyviä kandidaatteja eksomisekvenssointitutkimuksiin, joissa voidaan löytää uusia CMT:hen tai HSP:hen liittyviä geenejä. On myös mahdollista, vaikkakin epätodennäköistä, että juuri tuossa kohdassa on ollut huono lukupeitto sekvenssoinnissa. Ainakin sporadisten CMT-potilaiden osalta on myös mahdollista, ettei sairaus olekaan geneettinen, koska neuropatia voi liittyä myös muihin sairauksiin, kuten diabetekseen.

### 6.2.2 Patogeenisten mutaatioiden tunnistamisen ongelmat

Edellä olevissa kappaleissa tulee hyvin esiin käytännön problematiikka, kun yritetään etsiä tautia aiheuttavia mutaatioita näin heterogeenisissa sairauksissa. CMT2:een ja HSP:hen liittyviä geenejä on kummallakin sairaudella kymmeniä – ja niitä löydetään jatkuvasti lisää. Lisäksi monissa näistä geeneistä on runsaasti tunnettuja patogeenisiä mutaatioita, joissakin geeneissä kenties kaikki aminohappoa muuttavat mutaatiot ovat patogeenisiä. Tässä tutkimuksessa kaikki variantit *HINT1*-mutaatiota lukuun ottamatta olivat ennestään tuntemattomia. Tuntemattomien mutaatioiden patogeenisuuden vahvistaminen on haastavaa. Esimerkiksi *SPAST*-mutaatio HP47-potilaalla vaikutti patogeeniselta mutaatiolta, mutta sukulaisnäytteiden puuttuessa asiaa ei saatu lopullisesti varmennettua. Funktionaalisia tutkimuksiakaan ei käytännössä voida kaikille mutaatioille tehdä. Toisaalta tässä tutkimuksessa löytyi useita mahdollisina tautimutaatioina pidettyjä variantteja, jotka eivät segregoituneet suvussa fenotyypin kanssa, jolloin ne tuskin ovat patogeenisiä. Potilas HP55 taas on esimerkkinä tapauksesta, jossa löytyy kaksi mahdollisesti patogeenista varianttia. Sukulaisnäytteiden avulla saatiin todennäköinen sairauden aiheuttanut mutaatio selville. HP62-potilaan *SPAST*-variantti oli yllättävä. Useissa artikkeleissa on spekuloitu, että *SPAST*-geenissä kaikki aminohappoa muuttavat mutaatiot olisivat patogeenisiä ja polymorfismeja tunnetaan todella vähän (Fonknechten et al. 2000, McDermott et al. 2006). Variantti löytyi kuitenkin Sisu-tietokannasta ja niinkin korkealla frekvenssillä kuin 0,012, joten se ei mitenkään voi aiheuttaa harvinaista, dominoivasti periytyvää sairautta. Se, että joitakin variantteja ei löytynyt lainkaan 1000 Genomes- tai EVS-tietokannoista, mutta Sisu-tietokannasta suurellakin frekvenssillä, osoittaa sen, kuinka tärkeä on että kontrolliryhmänä ovat saman populaation edustajat. Toisaalta HP31-potilaan *LRSAMI*-variantti on hyvä esimerkki geenistä, johon liitetyt mutaatiot aiheuttavat samantyyppistä fenotyyppiä, mutta tunnetut mutaatiotyypit ja periytyminen eivät ole yleensä olleet samoja kuin tutkimallamme potilaalla. Lisäksi *LRSAMI*-variantti löytyy Sisu-tietokannasta. Ilman sukulaisnäytteitä on hyvin vaikea arvioida tämän variantin patogeenisuutta. Joten vaikka geenipaneelin sekvensointi ja alkuvaiheen varianttien suodattaminen on itsessään helppoa ja nopeaa, lopullisten varianttien patogeenisuuden arviointi ei sitä ole.

### 6.2.3 Kohdennetun NGS:n soveltuvuus diagnostiikassa

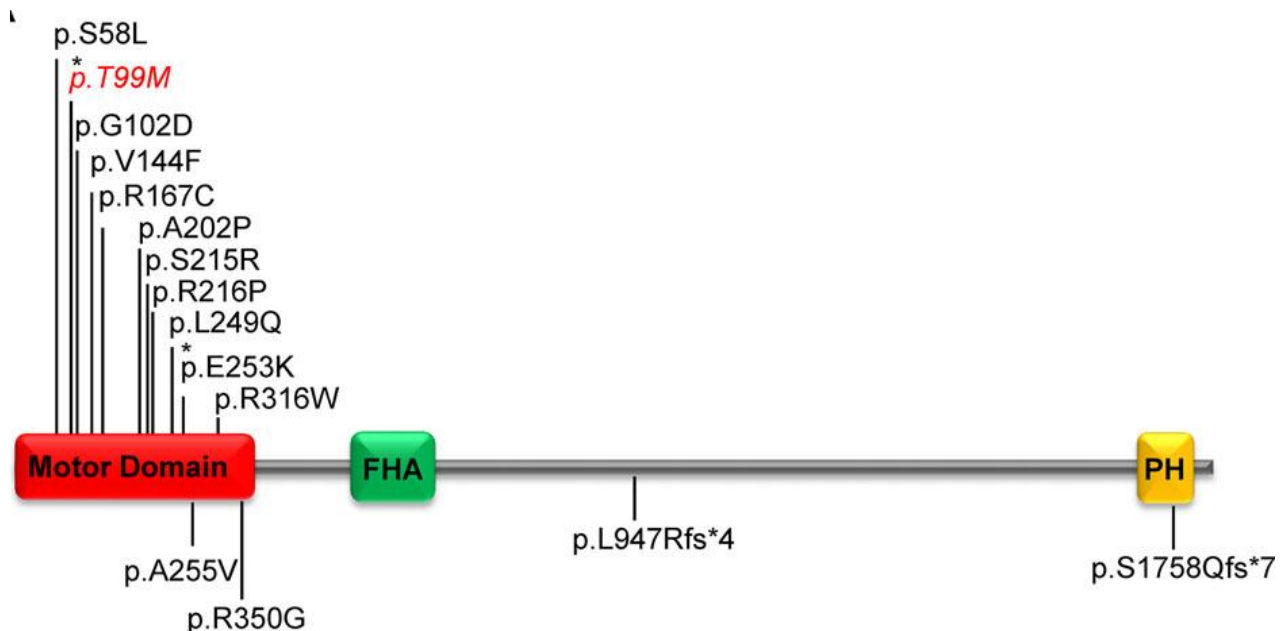
Kohdennettu uuden sukupolven sekvensointimenetelmä geenipaneelia käyttäen soveltuu hyvin heterogeenisten sairauksien tautimutaatioiden selvittämiseksi. Lukupeitot olivat kohtuullisen hyviä ja eksomisekvensointiin verrattuna aineiston käsittely oli huomattavasti nopeampaa. Vain noin 18 %



CMT-potilaista ja 30 % HSP-potilaista sai molekulaarisen diagnoosin, mutta suurimpana syynä tähän lienee se, että läheskään kaikkia näihin sairauksiin liittyviä geenejä ei ole vielä löydetty. Suurin osa löydetyistä potentiaalisista tautimutaatioista jää vaille täydellistä varmistusta, koska lähes kaikki mutaatiot olivat ennestään tuntemattomia ja lisäksi useiden potilaiden sukulaisilta ei ollut saatavissa näytettä sekvensoitavaksi. Tuntemattomat mutaatiot vaatisivat lopulliseksi varmistukseksi erilaisia funktionaalisia tutkimuksia. Tässä tutkimuksessa lukupeitot olivat optimaalista heikompia, mutta tätä pystyisi kehittämään esimerkiksi paremmalla koettimien suunnittelulla. Vaikka suurella osalla potilaista jäi geneettinen diagnoosi saavuttamatta ja monen kohdalla lopputulos oli epävarma, se on kuitenkin parannus nykytilanteeseen, jossa sekvensoidaan lähinnä yksittäisiä geenejä. Tulevaisuudessa luultavasti menetelmän hinta tulee entisestään laskemaan, joten tätä menetelmää voisi käyttää yhä enemmän heterogeenisten sairauksien diagnosoimisessa. CMT:ssä ja HSP:ssä geneettinen diagnoosi kertoo kuitenkin usein taudin etenemisestä ja ennusteesta ja sillä on myös merkitystä esimerkiksi perhesuunnittelussa.

## 6.3 Jatkotutkimukset

### 6.3.1 *KIF1A*-geenin *de novo* missense-mutaatiot moottoridomeenissa aiheuttavat vakavan taudinkuvan



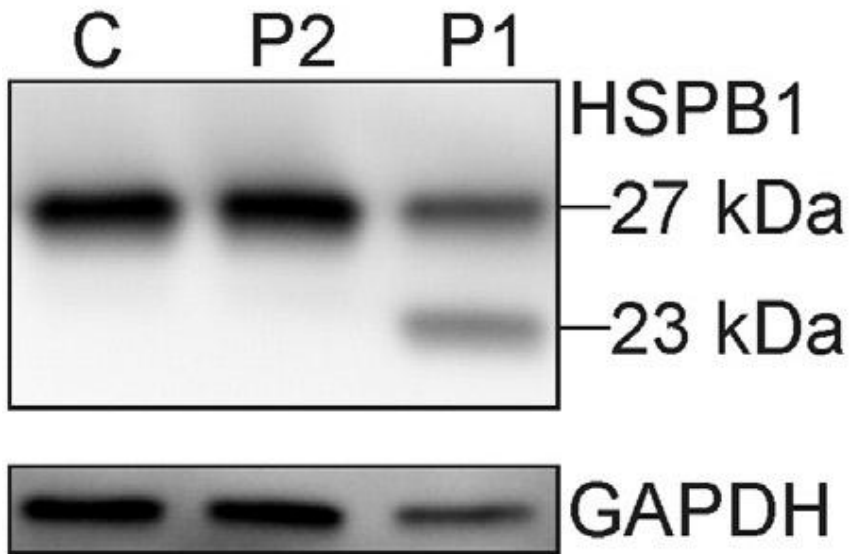
Kuva 6: *KIF1A*-geeni sekä siitä löydetty patogeeniset mutaatiot, jotka aiheuttavat samanlaisen fenotyypin, johon kuuluu mm. kehitysvamma. Kaikki mutaatiot ovat *de novo*-missense-mutaatioita *KIF1A*-geenin moottoridomeenissa. Tässä tutkimuksessa löytynyt mutaatio oli p.G102D. Funktionaaliset domeenit: Motor Domain = moottoridomeeni (aa 1-361), FHA-domeeni (516-572) ja PH-domeeni (1676-1774). (Lee et al. 2015)

Tässä tutkimuksessa kehitysvammaiselta HP51-potilaalta, jolla oli aikaisin alkanut HSP, löytyi *de novo* mutaatio p.G102D *KIF1A*:n moottoridomeenin alueelta. Vastaavia tapauksia löytyi tämän tutkimuksen aikana muualtakin, neljä Kanadasta, kolme USA:sta ja kuusi Hollannista. Kaavakuva *KIF1A*:sta sekä uudenlaiseen fenotyyppiin liittyvät mutaatiot on kuvattu kuvassa 6. Dominoivat *de novo*-missense-mutaatiot *KIF1A*:n moottoridomeenissa aiheuttavat erilaisen fenotyypin kuin aiemmin tunnetut resessiiviset mutaatiot: potilailla on kohtuullinen tai vakavan asteinen kehityksen tai älyn vamma ja lisäksi usein pikkuaivo-atrofia, näön vamma, spastinen parapareesi, perifeeraalinen neuropatia ja/tai epilepsia. Taudinkuvaltaan tämä uusi fenotyyppi on vakavampi kuin aiemmin tunnetut muodot, resessiiviset HSAN2 ja HSP, vaikka niiden oireissa on samankaltaisuutta. Mutaatio p.E253K aiheutti vakavimman taudinkuvan, jonka seurauksena potilaat kuolivat jo lapsina. Tässä tutkimuksessa löydetty mutaatio p.G102D sijaitsee *nucleotide-binding-pocket*-alueella, konservoi-

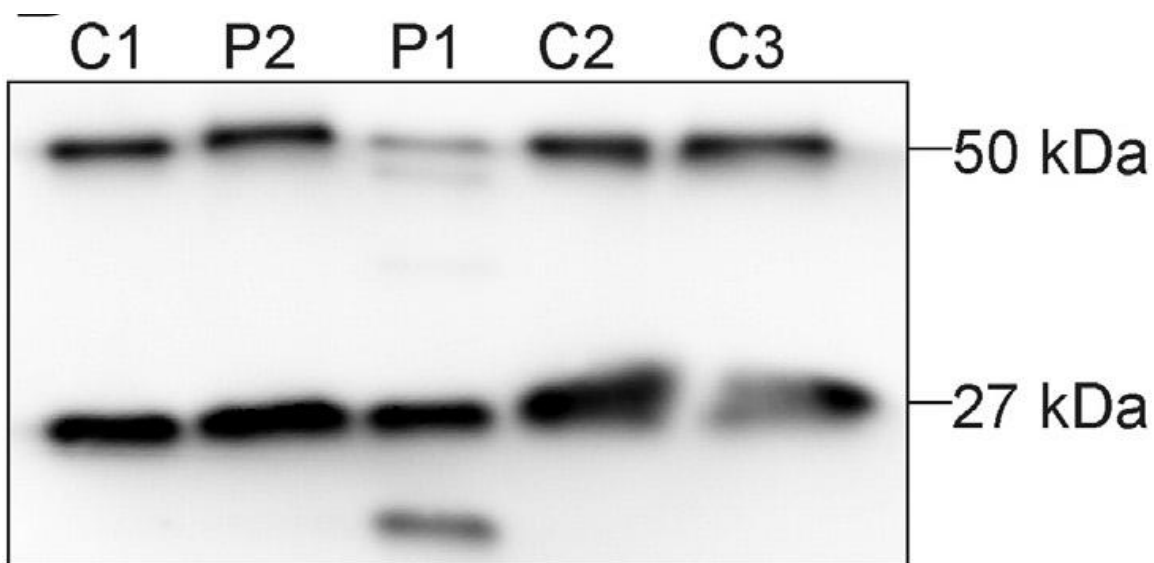
tuneessa P-loopissa, jonka tehtävänä on sitoa ATP:tä. Kinesiinit ovat mikrotubulusriippuvaisia molekyyli-moottoreita ja KIF1A on neuronispesifinen. Se kuljettaa synaptisten vesikkelien esiasteita nopeasti solun keskuksesta aksoneiden päihin. Näin se liittyy synaptiseen plastisuuteen sekä oppimiseen ja muistiin. G102D mutaatio häiritsee moottoridomeenin sitoutumista ATP:hen. Mutaatio indusoi konformaatiomuutoksen luopin rakenteessa, joka hajottaa interaktion ATP:n fosfaatin kanssa. Yleisesti tämän tyyppiset mutaatiot *KIF1A*-geenissä heikentävät moottoridomeenin kykyä siirtyä neuriittien ääreisosiin. Nämä dominoivasti periytyvät mutaatiot vaikuttavat siis dominantti negatiivisesti ja luultavasti siksi fenotyyppi on vakavampi kuin resessiivisissä mutaatioissa (Lee et al. 2015).

### **6.3.2 Lyhentynyt HSPB1 heikentää solun vastetta väärin laskostuneita proteiineja kohtaan**

Tässä tutkimuksessa löytyi CMT2-potilaalta *HSPB1*-geenistä deleetio p.Met169Cfs2X, joka aiheuttaa ennenaikaisen STOP-kodonin. Deleetio poistaa lähes koko proteiinin C-terminaalisen osan. Tutkimusryhmä jatkoi mutaation tutkimista tämän tutkimuksen jälkeen. Potilaan fibroblasteista eristettiin proteiinit ja tehtiin Western blot (Kuva 7). Lyhentynyt proteiini oli näkyvissä normaalipituisten proteiinin lisäksi, joten lyhentynyt muoto on stabiili. HSPB1:n pienin funktionaalinen yksikkö on luultavasti dimeerimuoto. Dimerisoitumista tutkittiin ei-pelkistävällä Western blotilla: näkyvissä oli monomeerin ja normaalin dimeerin lisäksi myös lyhentynyt proteiini dimerisoituneena normaalin proteiinin kanssa sekä kaksi keskenään dimerisoitunutta lyhentynyttä proteiinia, joten lyhentynyt proteiini kykenee dimerisoitumaan (Kuva 8). Fibroblastien lämpötoleranssia tutkittiin myös. Normaalissa lämpötilassa sekä potilaan fibroblastit että kontrollit kasvoivat normaalisti. Lämpökäsittelyn jälkeen potilaan fibroblastien joukossa oli enemmän kuolleita soluja ja kasvu oli hitaampaa. Deleetio vaikuttaa siis dominanttinegatiivisesti. Lyhentynyt proteiini heikentää solun toleranssia väärin laskostuneita proteiineja kohtaan. *HSPB1*-mutaatioita on tutkittu aikaisemmin lähinnä ylik-ekspressiotutkimuksilla, joten potilaan omia soluja tutkimalla saatiin uutta tietoa HSPB1-mutaatioiden vaikutuksista. Lisäksi HSPB1:n C-terminaaliosan funktioita ei ole aikaisemmin tunnettu hyvin, joten tämä tutkimus toi uutta tietoa sen toiminnasta (Ylikallio et al. 2015).



Kuva 7: Western blot kahden potilaan ja yhden kontrollin fibroblasteista. C: kontrolli, P1: Potilas, jolla *HSPB1*:ssä deleetio, P2: Potilas, jolla *HSPB1*-missense-mutaatio R127L. P1:ssä näkyy kaksi HSPB1-viivaa: normaali proteiini sekä lyhentynyt proteiini. Latauskontrollina GAPDH. (Ylikallio et al. 2015)



Kuva 8: Western blot fibroblasteille ei-pelkistävässä olosuhteissa, että HSPB1:n dimerisoituneet muodot saataisi näkyviin. C1-3: kontrollit, P1: potilas, jolla deleetio *HSPB1*-geenissä, P2: potilas jolla R127L heterotsygoottinen missense-mutaatio *HSPB1*-geenissä. P1-potilaalla näkyy noin 23 kDa:n kokoinen ylimääräinen proteiiniviiva, joka vastaa yhtä lyhentynyttä proteiinia, 27 kDa vastaa normaalia monomeeristä proteiinia, 50 kDa vastaa normaalipituisten proteiinien muodostamaa dimeeriä. P1:llä näkyy myös alle 50 kDa:n kokoinen tuote, joka vastaa normaalipituisen ja lyhentyneen proteiinin muodostamaa dimeeriä. (Ylikallio et al. 2015)

## **7. Kiitokset**

Koko Henna Tyynismaan tutkimusryhmä:

Henna Tyynismaa

Emil Ylikallio

Riitta Lehtinen

Taru Hilander

Svetlana Konovalova

## 8. Lähteet

1. Alazami, A.M., Adly, N., Al Dhalaan, H. & Alkuraya, F.S. 2011, "A nullimorphic ERLIN2 mutation defines a complicated hereditary spastic paraplegia locus (SPG18)", *Neurogenetics*, vol. 12, no. 4, pp. 333-336.
2. Antonellis, A., Ellsworth, R.E., Sambuughin, N., Puls, I., Abel, A., Lee-Lin, S.Q., Jordanova, A., Kremensky, I., Christodoulou, K., Middleton, L.T., Sivakumar, K., Ionasescu, V., Funalot, B., Vance, J.M., Goldfarb, L.G., Fischbeck, K.H. & Green, E.D. 2003, "Glycyl tRNA synthetase mutations in Charcot-Marie-Tooth disease type 2D and distal spinal muscular atrophy type V", *American Journal of Human Genetics*, vol. 72, no. 5, pp. 1293-1299.
3. Antonellis, A. & Green, E.D. 2008, "The role of aminoacyl-tRNA synthetases in genetic diseases", *Annual review of genomics and human genetics*, vol. 9, pp. 87-107.
4. Baets, J., De Jonghe, P. & Timmerman, V. 2014, "Recent advances in Charcot-Marie-Tooth disease", *Current opinion in neurology*, vol. 27, no. 5, pp. 532-540.
5. Baloh, R.H., Schmidt, R.E., Pestronk, A. & Milbrandt, J. 2007, "Altered axonal mitochondrial transport in the pathogenesis of Charcot-Marie-Tooth disease from mitofusin 2 mutations", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 27, no. 2, pp. 422-430.
6. Bamshad, M.J., Ng, S.B., Bigham, A.W., Tabor, H.K., Emond, M.J., Nickerson, D.A. & Shendure, J. 2011, "Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery", *Nature reviews.Genetics*, vol. 12, no. 11, pp. 745-755.
7. Basha, E., O'Neill, H. & Vierling, E. 2012, "Small heat shock proteins and alpha-crystallins: dynamic proteins with flexible functions", *Trends in biochemical sciences*, vol. 37, no. 3, pp. 106-117.
8. Bergoffen, J., Scherer, S.S., Wang, S., Scott, M.O., Bone, L.J., Paul, D.L., Chen, K., Lensch, M.W., Chance, P.F. & Fischbeck, K.H. 1993, "Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 262, no. 5142, pp. 2039-2042.
9. Blackstone, C. 2012, "Cellular pathways of hereditary spastic paraplegia", *Annual Review of Neuroscience*, vol. 35, pp. 25-47.
10. Blackstone, C., O'Kane, C.J. & Reid, E. 2011, "Hereditary spastic paraplegias: membrane traffic and the motor pathway", *Nature reviews.Neuroscience*, vol. 12, no. 1, pp. 31-42.
11. Casari, G., De Fusco, M., Ciarmatori, S., Zeviani, M., Mora, M., Fernandez, P., De Michele, G., Filla, A., Coccozza, S., Marconi, R., Durr, A., Fontaine, B. & Ballabio, A. 1998, "Spastic paraplegia and OXPHOS impairment caused by mutations in paraplegin, a nuclear-encoded mitochondrial metalloprotease", *Cell*, vol. 93, no. 6, pp. 973-983.
12. Cassereau, J., Chevrollier, A., Gueguen, N., Desquiret, V., Verny, C., Nicolas, G., Dubas, F., Amati-Bonneau, P., Reynier, P., Bonneau, D. & Procaccio, V. 2011, "Mitochondrial dysfunction and pathophysiology of Charcot-Marie-Tooth disease involving GDAP1 mutations", *Experimental neurology*, vol. 227, no. 1, pp. 31-41.
13. Clemen, C.S., Tangavelou, K., Strucksberg, K.H., Just, S., Gaertner, L., Regus-Leidig, H., Stumpf, M., Reimann, J., Coras, R., Morgan, R.O., Fernandez, M.P., Hofmann, A., Muller, S., Schoser, B., Hanisch,

- F.G., Rottbauer, W., Blumcke, I., von Horsten, S., Eichinger, L. & Schroder, R. 2010, "Strumpellin is a novel valosin-containing protein binding partner linking hereditary spastic paraplegia to protein aggregation diseases", *Brain : a journal of neurology*, vol. 133, no. 10, pp. 2920-2941.
14. Cuesta, A., Pedrola, L., Sevilla, T., Garcia-Planells, J., Chumillas, M.J., Mayordomo, F., LeGuern, E., Marin, I., Vilchez, J.J. & Palau, F. 2002, "The gene encoding ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 is mutated in axonal Charcot-Marie-Tooth type 4A disease", *Nature genetics*, vol. 30, no. 1, pp. 22-25.
  15. De Sandre-Giovannoli, A., Chaouch, M., Kozlov, S., Vallat, J.M., Tazir, M., Kassouri, N., Szepetowski, P., Hammadouche, T., Vandenberghe, A., Stewart, C.L., Grid, D. & Levy, N. 2002, "Homozygous defects in LMNA, encoding lamin A/C nuclear-envelope proteins, cause autosomal recessive axonal neuropathy in human (Charcot-Marie-Tooth disorder type 2) and mouse", *American Journal of Human Genetics*, vol. 70, no. 3, pp. 726-736.
  16. De Vos, K.J., Grierson, A.J., Ackerley, S. & Miller, C.C. 2008, "Role of axonal transport in neurodegenerative diseases", *Annual Review of Neuroscience*, vol. 31, pp. 151-173.
  17. Depienne, C., Stevanin, G., Brice, A. & Durr, A. 2007, "Hereditary spastic paraplegias: an update", *Current opinion in neurology*, vol. 20, no. 6, pp. 674-680.
  18. Depienne, C., Tallaksen, C., Lephay, J.Y., Bricka, B., Poëa-Guyon, S., Fontaine, B., Labauge, P., Brice, A. & Durr, A. 2006, "Spastin mutations are frequent in sporadic spastic paraparesis and their spectrum is different from that observed in familial cases", *Journal of medical genetics*, vol. 43, no. 3, pp. 259-265.
  19. Evgrafov, O.V., Mersiyanova, I., Irobi, J., Van Den Bosch, L., Dierick, I., Leung, C.L., Schagina, O., Verpoorten, N., Van Impe, K., Fedotov, V., Dadali, E., Auer-Grumbach, M., Windpassinger, C., Wagner, K., Mitrovic, Z., Hilton-Jones, D., Talbot, K., Martin, J.J., Vasserman, N., Tverskaya, S., Polyakov, A., Liem, R.K., Gettemans, J., Robberecht, W., De Jonghe, P. & Timmerman, V. 2004, "Mutant small heat-shock protein 27 causes axonal Charcot-Marie-Tooth disease and distal hereditary motor neuropathy", *Nature genetics*, vol. 36, no. 6, pp. 602-606.
  20. Fichera, M., Lo Giudice, M., Falco, M., Sturnio, M., Amata, S., Calabrese, O., Bigoni, S., Calzolari, E. & Neri, M. 2004, "Evidence of kinesin heavy chain (KIF5A) involvement in pure hereditary spastic paraplegia", *Neurology*, vol. 63, no. 6, pp. 1108-1110.
  21. Fink, J.K. 2003a, "Advances in the hereditary spastic paraplegias", *Experimental neurology*, vol. 184 Suppl 1, pp. S106-10.
  22. Fink, J.K. 2003b, "The hereditary spastic paraplegias: nine genes and counting", *Archives of Neurology*, vol. 60, no. 8, pp. 1045-1049.
  23. Finsterer, J., Loscher, W., Quasthoff, S., Wanschitz, J., Auer-Grumbach, M. & Stevanin, G. 2012, "Hereditary spastic paraplegias with autosomal dominant, recessive, X-linked, or maternal trait of inheritance", *Journal of the neurological sciences*, vol. 318, no. 1-2, pp. 1-18.
  24. Fonknechten, N., Mavel, D., Byrne, P., Davoine, C.S., Cruaud, C., Bonsch, D., Samson, D., Coutinho, P., Hutchinson, M., McMonagle, P., Burgunder, J.M., Tartaglione, A., Heinzlef, O., Feki, I., Deufel, T., Parfrey, N., Brice, A., Fontaine, B., Prud'homme, J.F., Weissenbach, J., Durr, A. & Hazan, J. 2000, "Spectrum of SPG4 mutations in autosomal dominant spastic paraplegia", *Human molecular genetics*, vol. 9, no. 4, pp. 637-644.

25. Freeman, C., Seaman, M.N. & Reid, E. 2013, "The hereditary spastic paraplegia protein strumpellin: characterisation in neurons and of the effect of disease mutations on WASH complex assembly and function", *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1832, no. 1, pp. 160-173.
26. Gentil, B.J. & Cooper, L. 2012, "Molecular basis of axonal dysfunction and traffic impairments in CMT", *Brain research bulletin*, vol. 88, no. 5, pp. 444-453.
27. Goh, G. & Choi, M. 2012, "Application of whole exome sequencing to identify disease-causing variants in inherited human diseases", *Genomics & informatics*, vol. 10, no. 4, pp. 214-219.
28. Goizet, C., Boukhris, A., Durr, A., Beetz, C., Truchetto, J., Tesson, C., Tsaousidou, M., Forlani, S., Guyant-Marechal, L., Fontaine, B., Guimaraes, J., Isidor, B., Chazouilleres, O., Wendum, D., Grid, D., Chevy, F., Chinnery, P.F., Coutinho, P., Azulay, J.P., Feki, I., Mochel, F., Wolf, C., Mhiri, C., Crosby, A., Brice, A. & Stevanin, G. 2009, "CYP7B1 mutations in pure and complex forms of hereditary spastic paraplegia type 5", *Brain : a journal of neurology*, vol. 132, no. Pt 6, pp. 1589-1600.
29. Guernsey, D.L., Jiang, H., Bedard, K., Evans, S.C., Ferguson, M., Matsuoka, M., Macgillivray, C., Nightingale, M., Perry, S., Rideout, A.L., Orr, A., Ludman, M., Skidmore, D.L., Benstead, T. & Samuels, M.E. 2010, "Mutation in the gene encoding ubiquitin ligase LRSAM1 in patients with Charcot-Marie-Tooth disease", *PLoS genetics*, vol. 6, no. 8, pp. 10.1371/journal.pgen.1001081.
30. Hamdan, F.F., Gauthier, J., Araki, Y., Lin, D.T., Yoshizawa, Y., Higashi, K., Park, A.R., Spiegelman, D., Dobrzeniecka, S., Piton, A., Tomitori, H., Daoud, H., Massicotte, C., Henrion, E., Diallo, O., S2D Group, Shekarabi, M., Marineau, C., Shevell, M., Maranda, B., Mitchell, G., Nadeau, A., D'Anjou, G., Vanasse, M., Srouf, M., Lafreniere, R.G., Drapeau, P., Lacaille, J.C., Kim, E., Lee, J.R., Igarashi, K., Hukanir, R.L., Rouleau, G.A. & Michaud, J.L. 2011, "Excess of de novo deleterious mutations in genes associated with glutamatergic systems in nonsyndromic intellectual disability", *American Journal of Human Genetics*, vol. 88, no. 3, pp. 306-316.
31. Hansen, J.J., Durr, A., Cournu-Rebeix, I., Georgopoulos, C., Ang, D., Nielsen, M.N., Davoine, C.S., Brice, A., Fontaine, B., Gregersen, N. & Bross, P. 2002, "Hereditary spastic paraplegia SPG13 is associated with a mutation in the gene encoding the mitochondrial chaperonin Hsp60", *American Journal of Human Genetics*, vol. 70, no. 5, pp. 1328-1332.
32. Hazan, J., Fonknechten, N., Mavel, D., Paternotte, C., Samson, D., Artiguenave, F., Davoine, C.S., Cruaud, C., Durr, A., Wincker, P., Brottier, P., Cattolico, L., Barbe, V., Burgunder, J.M., Prud'homme, J.F., Brice, A., Fontaine, B., Heilig, B. & Weissenbach, J. 1999, "Spastin, a new AAA protein, is altered in the most frequent form of autosomal dominant spastic paraplegia", *Nature genetics*, vol. 23, no. 3, pp. 296-303.
33. Hoyer, H., Braathen, G.J., Busk, O.L., Holla, O.L., Svendsen, M., Hilmarsen, H.T., Strand, L., Skjelbred, C.F. & Russell, M.B. 2014, "Genetic diagnosis of Charcot-Marie-Tooth disease in a population by next-generation sequencing", *BioMed research international*, vol. 2014, pp. 210401.
34. Jouet, M., Rosenthal, A., Armstrong, G., MacFarlane, J., Stevenson, R., Paterson, J., Metzenberg, A., Ionasescu, V., Temple, K. & Kenwrick, S. 1994, "X-linked spastic paraplegia (SPG1), MASA syndrome and X-linked hydrocephalus result from mutations in the L1 gene", *Nature genetics*, vol. 7, no. 3, pp. 402-407.
35. Klebe, S., Azzedine, H., Durr, A., Bastien, P., Bouslam, N., Elleuch, N., Forlani, S., Charon, C., Koenig, M., Melki, J., Brice, A. & Stevanin, G. 2006, "Autosomal recessive spastic paraplegia (SPG30) with mild atax-



ia and sensory neuropathy maps to chromosome 2q37.3", *Brain : a journal of neurology*, vol. 129, no. Pt 6, pp. 1456-1462.

36. Klebe, S., Lacour, A., Durr, A., Stojkovic, T., Depienne, C., Forlani, S., Poëa-Guyon, S., Vuillaume, I., Sablonniere, B., Vermersch, P., Brice, A. & Stevanin, G. 2007, "NIPA1 (SPG6) mutations are a rare cause of autosomal dominant spastic paraplegia in Europe", *Neurogenetics*, vol. 8, no. 2, pp. 155-157.
37. Klebe, S., Lossos, A., Azzedine, H., Mundwiler, E., Sheffer, R., Gaussen, M., Marelli, C., Nawara, M., Carpentier, W., Meyer, V., Rastetter, A., Martin, E., Bouteiller, D., Orlando, L., Gyapay, G., El-Hachimi, K.H., Zimmerman, B., Gamliel, M., Misk, A., Lerer, I., Brice, A., Durr, A. & Stevanin, G. 2012, "KIF1A missense mutations in SPG30, an autosomal recessive spastic paraplegia: distinct phenotypes according to the nature of the mutations", *European journal of human genetics : EJHG*, vol. 20, no. 6, pp. 645-649.
38. Kleopa, K.A., Abrams, C.K. & Scherer, S.S. 2012, "How do mutations in GJB1 cause X-linked Charcot-Marie-Tooth disease?", *Brain research*, vol. 1487, pp. 198-205.
39. Kumar, K.R., Blair, N.F., Vandebona, H., Liang, C., Ng, K., Sharpe, D.M., Grunewald, A., Golnitz, U., Saviouk, V., Rolfs, A., Klein, C. & Sue, C.M. 2013, "Targeted next generation sequencing in SPAST-negative hereditary spastic paraplegia", *Journal of neurology*, vol. 260, no. 10, pp. 2516-2522.
40. Landouere, G., Zdebik, A.A., Martinez, T.L., Burnett, B.G., Stanescu, H.C., Inada, H., Shi, Y., Taye, A.A., Kong, L., Munns, C.H., Choo, S.S., Phelps, C.B., Paudel, R., Houlden, H., Ludlow, C.L., Caterina, M.J., Gaudet, R., Kleta, R., Fischbeck, K.H. & Sumner, C.J. 2010, "Mutations in TRPV4 cause Charcot-Marie-Tooth disease type 2C", *Nature genetics*, vol. 42, no. 2, pp. 170-174.
41. Lassuthova, P., Brozkova, D.S., Krutova, M., Neupauerova, J., Haberlova, J., Mazanec, R., Dvorackova, N., Goldenberg, Z. & Seeman, P. 2015, "Mutations in HINT1 are one of the most frequent causes of hereditary neuropathy among Czech patients and neuromyotonia is rather an underdiagnosed symptom", *Neurogenetics*, vol. 16, no. 1, pp. 43-54.
42. Lee, J.R., Srour, M., Kim, D., Hamdan, F.F., Lim, S.H., Brunel-Guitton, C., Decarie, J.C., Rossignol, E., Mitchell, G.A., Schreiber, A., Moran, R., Van Haren, K., Richardson, R., Nicolai, J., Oberndorff, K.M., Wagner, J.D., Boycott, K.M., Rahikkala, E., Junna, N., Tyynismaa, H., Cuppen, I., Verbeek, N.E., Stumpel, C.T., Willemsen, M.A., de Munnik, S.A., Rouleau, G.A., Kim, E., Kamsteeg, E.J., Kleefstra, T. & Michaud, J.L. 2015, "De novo mutations in the motor domain of KIF1A cause cognitive impairment, spastic paraparesis, axonal neuropathy, and cerebellar atrophy", *Human mutation*, vol. 36, no. 1, pp. 69-78.
43. Lemke, J.R., Riesch, E., Scheurenbrand, T., Schubach, M., Wilhelm, C., Steiner, I., Hansen, J., Courage, C., Gallati, S., Burki, S., Strozzi, S., Simonetti, B.G., Grunt, S., Steinlin, M., Alber, M., Wolff, M., Klopstock, T., Prott, E.C., Lorenz, R., Spaich, C., Rona, S., Lakshminarasimhan, M., Kroll, J., Dorn, T., Kramer, G., Synofzik, M., Becker, F., Weber, Y.G., Lerche, H., Böhm, D. & Biskup, S. 2012, "Targeted next generation sequencing as a diagnostic tool in epileptic disorders", *Epilepsia*, vol. 53, no. 8, pp. 1387-1398.
44. Lim, E.T., Wurtz, P., Havulinna, A.S., Palta, P., Tukiainen, T., Rehnström, K., Esko, T., Magi, R., Inouye, M., Lappalainen, T., Chan, Y., Salem, R.M., Lek, M., Flannick, J., Sim, X., Manning, A., Ladenvall, C., Bumpstead, S., Hamalainen, E., Aalto, K., Maksimow, M., Salmi, M., Blankenberg, S., Ardissino, D., Shah, S., Horne, B., McPherson, R., Hovingh, G.K., Reilly, M.P., Watkins, H., Goel, A., Farrall, M., Girelli, D., Reiner, A.P., Stitzel, N.O., Kathiresan, S., Gabriel, S., Barrett, J.C., Lehtimäki, T., Laakso, M., Groop, L., Kaprio, J., Perola, M., McCarthy, M.I., Boehnke, M., Altshuler, D.M., Lindgren, C.M., Hirschhorn, J.N., Metspalu, A., Freimer, N.B., Zeller, T., Jalkanen, S., Koskinen, S., Raitakari, O., Durbin, R., MacArthur, D.G., Salomaa, V., Ripatti, S., Daly, M.J., Palotie, A. & Sequencing Initiative Suomi (SISu) Project 2014,

"Distribution and medical impact of loss-of-function variants in the Finnish founder population", *PLoS genetics*, vol. 10, no. 7, pp. e1004494.

45. Lo Giudice, T., Lombardi, F., Santorelli, F.M., Kawarai, T. & Orlacchio, A. 2014, "Hereditary spastic paraplegia: clinical-genetic characteristics and evolving molecular mechanisms", *Experimental neurology*, vol. 261, pp. 518-539.
46. Mardis, E.R. 2008, "Next-generation DNA sequencing methods", *Annual review of genomics and human genetics*, vol. 9, pp. 387-402.
47. McDermott, C.J., Burness, C.E., Kirby, J., Cox, L.E., Rao, D.G., Hewamadduma, C., Sharrack, B., Hadjivassiliou, M., Chinnery, P.F., Dalton, A., Shaw, P.J. & UK and Irish HSP Consortium 2006, "Clinical features of hereditary spastic paraplegia due to spastin mutation", *Neurology*, vol. 67, no. 1, pp. 45-51.
48. Mersiyanova, I.V., Perepelov, A.V., Polyakov, A.V., Sitnikov, V.F., Dadali, E.L., Oparin, R.B., Petrin, A.N. & Evgrafov, O.V. 2000, "A new variant of Charcot-Marie-Tooth disease type 2 is probably the result of a mutation in the neurofilament-light gene", *American Journal of Human Genetics*, vol. 67, no. 1, pp. 37-46.
49. Metzker, M.L. 2010, "Sequencing technologies - the next generation", *Nature reviews.Genetics*, vol. 11, no. 1, pp. 31-46.
50. Montenegro, G., Rebelo, A.P., Connell, J., Allison, R., Babalini, C., D'Aloia, M., Montieri, P., Schule, R., Ishiura, H., Price, J., Strickland, A., Gonzalez, M.A., Baumbach-Reardon, L., Deconinck, T., Huang, J., Bernardi, G., Vance, J.M., Rogers, M.T., Tsuji, S., De Jonghe, P., Pericak-Vance, M.A., Schols, L., Orlacchio, A., Reid, E. & Zuchner, S. 2012, "Mutations in the ER-shaping protein reticulon 2 cause the axon-degenerative disorder hereditary spastic paraplegia type 12", *The Journal of clinical investigation*, vol. 122, no. 2, pp. 538-544.
51. Myllykangas, S., Koskenvuo, J.W. & Alastalo, T.P. 2013, "Novel high-throughput sequencing strategies in genetic diagnostics", *Duodecim; laaketieteellinen aikakauskirja*, vol. 129, no. 2, pp. 141-148.
52. Namekawa, M., Muriel, M.P., Janer, A., Latouche, M., Dauphin, A., Debeir, T., Martin, E., Duyckaerts, C., Prigent, A., Depienne, C., Sittler, A., Brice, A. & Ruberg, M. 2007, "Mutations in the SPG3A gene encoding the GTPase atlastin interfere with vesicle trafficking in the ER/Golgi interface and Golgi morphogenesis", *Molecular and cellular neurosciences*, vol. 35, no. 1, pp. 1-13.
53. Namekawa, M., Ribai, P., Nelson, I., Forlani, S., Fellmann, F., Goizet, C., Depienne, C., Stevanin, G., Ruberg, M., Durr, A. & Brice, A. 2006, "SPG3A is the most frequent cause of hereditary spastic paraplegia with onset before age 10 years", *Neurology*, vol. 66, no. 1, pp. 112-114.
54. Park, S.H., Zhu, P.P., Parker, R.L. & Blackstone, C. 2010, "Hereditary spastic paraplegia proteins REEP1, spastin, and atlastin-1 coordinate microtubule interactions with the tubular ER network", *The Journal of clinical investigation*, vol. 120, no. 4, pp. 1097-1110.
55. Patzko, A. & Shy, M.E. 2011, "Update on Charcot-Marie-Tooth disease", *Current neurology and neuroscience reports*, vol. 11, no. 1, pp. 78-88.
56. Reilly, M.M., Murphy, S.M. & Laura, M. 2011, "Charcot-Marie-Tooth disease", *Journal of the peripheral nervous system : JPNS*, vol. 16, no. 1, pp. 1-14.

57. Reilly, M.M. & Shy, M.E. 2009, "Diagnosis and new treatments in genetic neuropathies", *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, vol. 80, no. 12, pp. 1304-1314.
58. Sanderson, C.M., Connell, J.W., Edwards, T.L., Bright, N.A., Duley, S., Thompson, A., Luzio, J.P. & Reid, E. 2006, "Spastin and atlastin, two proteins mutated in autosomal-dominant hereditary spastic paraplegia, are binding partners", *Human molecular genetics*, vol. 15, no. 2, pp. 307-318.
59. Saxton, W.M. & Hollenbeck, P.J. 2012, "The axonal transport of mitochondria", *Journal of cell science*, vol. 125, no. Pt 9, pp. 2095-2104.
60. Shy, M.E. & Patzko, A. 2011, "Axonal Charcot-Marie-Tooth disease", *Current opinion in neurology*, vol. 24, no. 5, pp. 475-483.
61. Shy, M.E., Siskind, C., Swan, E.R., Krajewski, K.M., Doherty, T., Fuerst, D.R., Ainsworth, P.J., Lewis, R.A., Scherer, S.S. & Hahn, A.F. 2007, "CMT1X phenotypes represent loss of GJB1 gene function", *Neurology*, vol. 68, no. 11, pp. 849-855.
62. Sikkema-Raddatz, B., Johansson, L.F., de Boer, E.N., Almomani, R., Boven, L.G., van den Berg, M.P., van Spaendonck-Zwarts, K.Y., van Tintelen, J.P., Sijmons, R.H., Jongbloed, J.D. & Sinke, R.J. 2013, "Targeted next-generation sequencing can replace Sanger sequencing in clinical diagnostics", *Human mutation*, vol. 34, no. 7, pp. 1035-1042.
63. Soinila, S., Kaste, M. & Somer, H. 2006, *Neurologia*, 2. uud. p. edn, Duodecim, Helsinki.
64. Sulonen, A.M., Ellonen, P., Almusa, H., Lepisto, M., Eldfors, S., Hannula, S., Miettinen, T., Tynismaa, H., Salo, P., Heckman, C., Joensuu, H., Raivio, T., Suomalainen, A. & Saarela, J. 2011, "Comparison of solution-based exome capture methods for next generation sequencing", *Genome biology*, vol. 12, no. 9, pp. R94-2011-12-9-r94.
65. Svenstrup, K., Giraud, G., Boespflug-Tanguy, O., Danielsen, E.R., Thomsen, C., Rasmussen, K., Law, I., Vogel, A., Stokholm, J., Crone, C., Hjermand, L.E. & Nielsen, J.E. 2010, "Hereditary spastic paraplegia caused by the PLP1 'rumpshaker mutation'", *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, vol. 81, no. 6, pp. 666-672.
66. Szigeti, K. & Lupski, J.R. 2009, "Charcot-Marie-Tooth disease", *European journal of human genetics : EJHG*, vol. 17, no. 6, pp. 703-710.
67. Tang, B.S., Zhao, G.H., Luo, W., Xia, K., Cai, F., Pan, Q., Zhang, R.X., Zhang, F.F., Liu, X.M., Chen, B., Zhang, C., Shen, L., Jiang, H., Long, Z.G. & Dai, H.P. 2005, "Small heat-shock protein 22 mutated in autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease type 2L", *Human genetics*, vol. 116, no. 3, pp. 222-224.
68. Timmerman, V., Clowes, V.E. & Reid, E. 2013, "Overlapping molecular pathological themes link Charcot-Marie-Tooth neuropathies and hereditary spastic paraplegias", *Experimental neurology*, vol. 246, pp. 14-25.
69. Tsang, H.T., Edwards, T.L., Wang, X., Connell, J.W., Davies, R.J., Durrington, H.J., O'Kane, C.J., Luzio, J.P. & Reid, E. 2009, "The hereditary spastic paraplegia proteins NIPA1, spastin and spartin are inhibitors of mammalian BMP signalling", *Human molecular genetics*, vol. 18, no. 20, pp. 3805-3821.

70. Valdmanis, P.N., Meijer, I.A., Reynolds, A., Lei, A., MacLeod, P., Schlesinger, D., Zatz, M., Reid, E., Dion, P.A., Drapeau, P. & Rouleau, G.A. 2007, "Mutations in the KIAA0196 gene at the SPG8 locus cause hereditary spastic paraplegia", *American Journal of Human Genetics*, vol. 80, no. 1, pp. 152-161.
71. Verhoeven, K., De Jonghe, P., Coen, K., Verpoorten, N., Auer-Grumbach, M., Kwon, J.M., FitzPatrick, D., Schmedding, E., De Vriendt, E., Jacobs, A., Van Gerwen, V., Wagner, K., Hartung, H.P. & Timmerman, V. 2003a, "Mutations in the small GTP-ase late endosomal protein RAB7 cause Charcot-Marie-Tooth type 2B neuropathy", *American Journal of Human Genetics*, vol. 72, no. 3, pp. 722-727.
72. Verhoeven, K., De Jonghe, P., Van de Putte, T., Nelis, E., Zwijsen, A., Verpoorten, N., De Vriendt, E., Jacobs, A., Van Gerwen, V., Francis, A., Ceuterick, C., Huylebroeck, D. & Timmerman, V. 2003b, "Slowed conduction and thin myelination of peripheral nerves associated with mutant rho Guanine-nucleotide exchange factor 10", *American Journal of Human Genetics*, vol. 73, no. 4, pp. 926-932.
73. Weedon, M.N., Hastings, R., Caswell, R., Xie, W., Paszkiewicz, K., Antoniadis, T., Williams, M., King, C., Greenhalgh, L., Newbury-Ecob, R. & Ellard, S. 2011, "Exome sequencing identifies a DYNC1H1 mutation in a large pedigree with dominant axonal Charcot-Marie-Tooth disease", *American Journal of Human Genetics*, vol. 89, no. 2, pp. 308-312.
74. Ylikallio, E., Johari, M., Konovalova, S., Moilanen, J.S., Kiuru-Enari, S., Auranen, M., Pajunen, L. & Tynismaa, H. 2014, "Targeted next-generation sequencing reveals further genetic heterogeneity in axonal Charcot-Marie-Tooth neuropathy and a mutation in HSPB1", *European journal of human genetics : EJHG*, vol. 22, no. 4, pp. 522-527.
75. Ylikallio, E., Konovalova, S., Dhungana, Y., Hilander, T., Junna, N., Partanen, J.V., Toppila, J.P., Auranen, M. & Tynismaa, H. 2015, "Truncated HSPB1 causes axonal neuropathy and impairs tolerance to unfolded protein stress", *BBA Clinical*, vol. 3, no. 0, pp. 233-242.
76. Zhao, X., Alvarado, D., Rainier, S., Lemons, R., Hedera, P., Weber, C.H., Tukel, T., Apak, M., Heiman-Patterson, T., Ming, L., Bui, M. & Fink, J.K. 2001, "Mutations in a newly identified GTPase gene cause autosomal dominant hereditary spastic paraplegia", *Nature genetics*, vol. 29, no. 3, pp. 326-331.
77. Zimon, M., Baets, J., Almeida-Souza, L., De Vriendt, E., Nikodinovic, J., Parman, Y., Battaloglu, E., Matur, Z., Guergueltcheva, V., Tournev, I., Auer-Grumbach, M., De Rijk, P., Petersen, B.S., Muller, T., Franssen, E., Van Damme, P., Loscher, W.N., Barisic, N., Mitrovic, Z., Previtali, S.C., Topaloglu, H., Bernert, G., Beleza-Meireles, A., Todorovic, S., Savic-Pavicevic, D., Ishpekova, B., Lechner, S., Peeters, K., Ooms, T., Hahn, A.F., Zuchner, S., Timmerman, V., Van Dijck, P., Rasic, V.M., Janecke, A.R., De Jonghe, P. & Jordanova, A. 2012, "Loss-of-function mutations in HINT1 cause axonal neuropathy with neuromyotonia", *Nature genetics*, vol. 44, no. 10, pp. 1080-1083.
78. Zuchner, S., Mersiyanova, I.V., Muglia, M., Bissar-Tadmouri, N., Rochelle, J., Dadali, E.L., Zappia, M., Nelis, E., Patitucci, A., Senderek, J., Parman, Y., Evgrafov, O., Jonghe, P.D., Takahashi, Y., Tsuji, S., Pericak-Vance, M.A., Quattrone, A., Battaloglu, E., Polyakov, A.V., Timmerman, V., Schroder, J.M. & Vance, J.M. 2004, "Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A", *Nature genetics*, vol. 36, no. 5, pp. 449-451.
79. Zuchner, S. & Vance, J.M. 2006, "Molecular genetics of autosomal-dominant axonal Charcot-Marie-Tooth disease", *Neuromolecular medicine*, vol. 8, no. 1-2, pp. 63-74.

80. Zuchner, S., Wang, G., Tran-Viet, K.N., Nance, M.A., Gaskell, P.C., Vance, J.M., Ashley-Koch, A.E. & Pericak-Vance, M.A. 2006, "Mutations in the novel mitochondrial protein REEP1 cause hereditary spastic paraplegia type 31", *American Journal of Human Genetics*, vol. 79, no. 2, pp. 365-369.

## Internet-lähteet

1000 Genomes Project, <http://browser.1000genomes.org/index.html>, frekvenssit haettu 2013

Broad Institute, Integrative genomics viewer (IGV), <https://www.broadinstitute.org/igv/>, 2013

NHLB Exome Sequencing Project (ESP), Exome Variant Server

<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>, frekvenssit haettu 2013

NCBI, Homologene <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene/>, konservoitumista haettu 10.2014

Johns Hopkins University, Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) <http://omim.org/>, 2013

Primer 3 (v. 0.4.0), <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>, käytetty 2013

J. Craig Venter Institute, SIFT Genome Tool,

[http://sift.jcvi.org/www/SIFT\\_chr\\_coords\\_submit.html](http://sift.jcvi.org/www/SIFT_chr_coords_submit.html), käytetty 2013

Sequencing Initiative Suomi (SISu), <http://sisu.fimm.fi/>, käytetty 12.2014

USCS Genome Browser, <http://genome.ucsc.edu/>, sekvenssejä haettu 2013 ja konservoitumista haettu 10.2014